



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

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

Tese de Mestrado em Fruticultura Integrada

Orientador: Professor Coordenador Doutor João Pedro Martins da Luz

**Francisco José Pereira Vieira**

Castelo Branco

2009

As doutrinas expressas neste trabalho são da  
inteira responsabilidade do seu autor.

## Resumo

O pedrado, causado pelo fungo *Venturia inaequalis*, é uma das doenças-chave da macieira. A aplicação de fungicidas, para o seu controlo, representa a maior parte das intervenções fitossanitárias realizadas num pomar.

A conjugação do elevado risco de desenvolvimento de resistência por parte de *V. inaequalis*, com o elevado risco para induzir resistência inerente às estrobilurinas e o facto de se verificarem infecções de pedrado em pomares tratados com estrobilurinas, vaticinaram que podem existir fenómenos de resistência na região da Cova da Beira.

Neste trabalho, foram realizados dois tipos de ensaios: ensaio de campo e ensaio *in vitro*. No ensaio de campo, foram testadas as duas estrobilurinas homologadas em Portugal para o pedrado (cresoxime-metilo e trifloxistrobina), utilizando como referência a dodina. Este ensaio foi realizado em dois pomares da Cova da Beira, com histórico diferente de aplicação de estrobilurinas, denominados pomar de alto risco e pomar de baixo risco. No ensaio *in vitro*, foram utilizados conídios de lesões de pedrado provenientes dos dois pomares, onde se efectuou o ensaio de eficácia de campo, e ainda de lesões, provenientes de zona não frutícola, nunca tratadas com os fungicidas testados.

O ensaio *in vitro* revelou total resistência do pedrado às estrobilurinas do pomar de alto risco. Este facto foi comprovado pelo ensaio de campo, onde a maior parte das folhas e frutos apresentavam infecções à colheita. No pomar de baixo risco, verificou-se a existência de cerca de um terço de conídios germinados na presença de estrobilurinas, contudo, este nível de resistência, não se reflectiu numa perda significativa de eficácia no ensaio de campo.

**Palavras-chave:** *Venturia inaequalis*; macieira; Cova da Beira; estrobilurinas; resistência.

## **Abstract**

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

The apple scab, caused by the fungus *Venturia inaequalis*, is one of apple trees key diseases. The application of fungicides for control of apple scab represents the bulk of interventions undertaken in an apple orchard.

The combination of high risk of developing resistance by *V. inaequalis* with the intrinsic high risk of strobilurins to induce resistance and the fact that exist infections in orchards treated with strobilurins, predict that there may be resistance in Cova da Beira.

Two kind of trial were carried out, field and *in vitro* trials. In field trials, the two strobilurins approved in Portugal (kresoxim-methyl and trofloxistrobin) were tested for apple scab and dodine was used as reference. These trials were carried out in two orchards of Cova da Beira with different strobilurin application history, a high risk resistance orchard and a low risk orchard. In the *in vitro* trial conidia from leaf lesions of the two orchards were used and leaf lesions from a non-apple production zone never sprayed with de fungicides tested.

The *in vitro* trial showed total resistance of apple scab to strobilurins in the high risk orchard. This was confirmed by the field trial, where most of the leaves and fruits were infected. In the low risk orchard, a third of the conidia germinated in the presence of strobilurins, however, this level of resistance was not confirmed with a corresponding significant loss of efficacy in the field trial.

**Key-words:** *Venturia inaequalis*; apple; Cova da Beira; strobilurins; resistance.

# Índice

Introdução .....	1
1. Macieira .....	3
2. O Pedrado da macieira.....	4
2.1. Importância .....	5
2.2. Sintomas.....	6
2.3. Ciclo de vida .....	8
2.4. Condições para o desenvolvimento.....	9
2.5. Monitorização .....	14
2.6. Meios de luta.....	14
2.7. Resistência .....	16
3. Material e métodos .....	21
3.1. Ensaio de campo .....	21
3.1.1. Os pomares .....	21
3.1.2. Modalidades.....	22
3.1.3. Execução do ensaio.....	23
3.1.4. Amostragem.....	23
3.1.5. Delineamento experimental e análise estatística .....	25
3.2. Ensaio <i>in vitro</i> .....	25
3.2.1. Origem do material vegetal .....	25
3.2.2. Fungicidas testados .....	26
3.2.3. Produção de inóculo .....	27
3.2.4. Inoculação.....	27
3.2.5. Observação .....	28
3.2.6. Delineamento experimental e análise estatística .....	28
4. Resultados e discussão.....	29
4.1. Ensaio de campo .....	29
4.1.1. Avaliação de folhas com pedrado.....	29
4.1.2. Avaliação de frutos com pedrado .....	33
4.2. Ensaio <i>in vitro</i> .....	35

4.3. Ensaio de campo vs. ensaio <i>in vitro</i> .....	39
5. Conclusões .....	41
Referências bibliográficas .....	43
Anexo 1 – Contagem de folhas com lesões de pedrado no ensaio de campo.....	I
Anexo 2 – Contagem de frutos com lesões de pedrado no ensaio de campo .....	III
Anexo 3 – Contagem de esporos germinados no ensaio <i>in vitro</i> .....	IV

## Introdução

O pedrado causado pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. é a principal doença-chave da macieira.

Desde a intensificação da fruticultura, no início do séc. XX, o pedrado começou a merecer a atenção dos fruticultores. Este período coincidiu com a descoberta dos primeiros fungicidas. Estes, nos últimos 50 anos, desempenharam um papel fundamental no combate ao pedrado.

A selecção dos fungicidas pelos fruticultores, para o combate ao pedrado, reflecte essencialmente os factores económicos e a eficácia, e menos o risco potencial de desenvolvimento de resistências. Contudo, a utilização repetida de fungicidas no combate a *V. inaequalis*, tem conduzido, ao longo dos anos, ao desenvolvimento de resistências em várias famílias químicas de fungicidas. A resistência a fungicidas começou a tomar maiores proporções, com a introdução de substâncias activas com actuação num único processo vital do agente patogénico e também devido às aplicações repetidas num mesmo ciclo de infecção. Em condições de campo, as aplicações de fungicidas não demonstram facilmente a existência de resistências, apesar do surgimento de subpopulações mais resistentes.

Com a redução da capacidade de combate ao pedrado, por parte de alguns fungicidas que possam ter desenvolvido resistências, poderá ocorrer, para além do prejuízo do agricultor, a redução de substâncias activas ou famílias químicas com a mesma forma de actuação. Se tivermos em consideração que as principais variedades de maçã comercializadas, são sensíveis ao pedrado, depreende-se que é essencial dispormos de meios eficazes de controlo.

A retirada de várias substâncias activas, anteriormente e actualmente disponíveis, através da revisão da Directiva 91/414/CEE, colocou e colocará ainda mais pressão de resistência nas que permanecerem. No sentido de otimizar a utilização dos fungicidas e evitar a redução de eficácia, é essencial adoptar estratégias de utilização sustentáveis e monitorizar a sensibilidade das populações de *V. inaequalis*.

Aparentes perdas de eficácia das estrobilurinas em pomares comerciais tem sido reportadas por alguns fruticultores, que associado à forma de acção das estrobilurinas e ao risco de *V. inaequalis* para o desenvolvimento de resistência, levanta a hipótese de que possam existir fenómenos de resistência na região da Cova da Beira. O presente trabalho visa investigar a eficácia das estrobilurinas, após uma década de utilização.

Foram realizados ensaios de campo e ensaios *in vitro*, no sentido de investigar a eficácia de estrobilurinas. No ensaio de campo utilizou-se a substância activa dodina como referência. No ensaio *in vitro* a metodologia seguida foi a preconizada pelo FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) para as estrobilurinas. Contudo, de modo a tentar adaptar ou verificar a viabilidade desta metodologia bastante expedita, resolveu-se testar também mais duas substâncias activas homologadas para o pedrado da macieira, o ciprodinil e a dodina.



# 1. Macieira

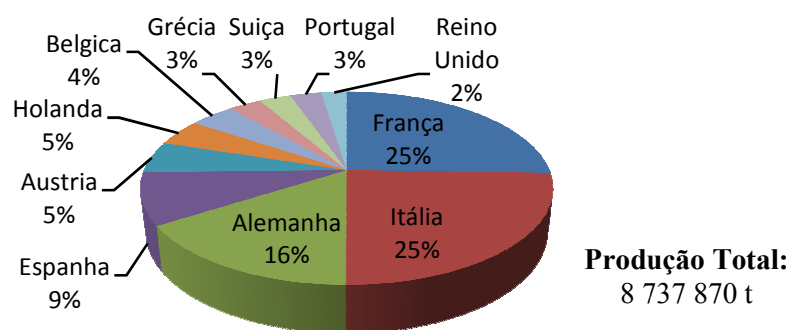
A macieira pertence à família Rosaceae, sub-família Pomoideae e género *Malus*. A macieira cultivada é a espécie *Malus domestica* Borkhausen.

Segundo Leppik (1970), o género *Malus* terá tido origem em cinco centros geográficos – Ásia Oriental, Ásia Central, Cáucaso, Europa e América do Norte. Por sua vez, Brown (1975) refere que o centro de origem é o Sudoeste da Ásia (Cáucaso). A origem e dispersão do cultivo da maçã terão ocorrido com a expansão dos impérios Gregos e Romanos, alguns séculos antes de Cristo (Brown, 1975).

Na Europa, até ao séc. XX, as macieiras eram plantadas de forma pouco organizada, com elevados espaçamentos e misturadas com diferentes variedades e outras espécies frutícolas. As novas formas de cultivo das macieiras, iniciadas no início do séc. XX, começaram a aumentar a importância deste fruto (MacHardy *et al.*, 2001).

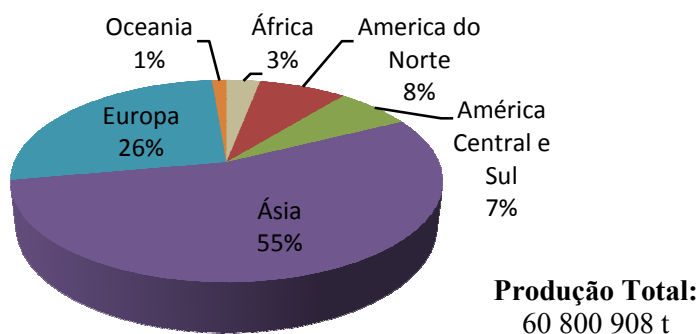
A fruticultura portuguesa, até aos anos 30 do século passado, baseava-se em árvores dispersas, com base em cultivares regionais bastante diversas (Costa, 1998). A partir da década de 60, na sequência do que ocorreu noutros países da Europa, embora que, com uns 15 anos de atraso, assiste-se à expansão dos pomares de maçã, com acentuada preferência pela cultivar Golden Delicious e algumas cultivares vermelhas do tipo Starking (Rocha *et al.*, 1991).

A produção de maçã em Portugal é baixa comparando com alguns países europeus (Fig. 1), sendo cerca de 250 000 t, na média entre 2000 e 2007 e resulta do cultivo de 20 700 ha, de pomares (FAOSTAT, 2009).



**Figura 1** – Distribuição percentual da produção de maçã em alguns países da União Europeia. Média do período de 2000-2007. FAOSTAT (2009).

A nível mundial, produz-se actualmente mais de 60 milhões de toneladas de maçã, sendo a Ásia, nomeadamente a China, o principal produtor (Fig. 2).



**Figura 2** – Distribuição percentual da produção mundial de maçã, por continentes. Média do período 2000-2007. (FAOSTAT, 2009)

## 2. O Pedrado da macieira

O pedrado é causado pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter (anamorfo: *Spilocaea pomi* Fr. ex Fr.) que pertence à classe Loculoascomycetes, ordem Pleosporales e família Venturiaceae (Ponti & Laffi, 1988).

Na sua fase sexual, *V. inaequalis* produz estruturas reprodutivas – pseudotecas – de cor castanha a preta, com forma globosa, com 90–150 µm de diâmetro, agrupados ou dispersos nas folhas caídas no solo. Cada pseudoteca contém no seu interior, um número variável de ascos, entre 50 a 100, longos, cilíndricos, medindo 55–75 µm por 6–12 µm. Cada asco contém 8 ascósporos septados com 11–15 µm por 5–7 µm, que são hialinos quando recém-formados e castanho claros quando maduros. Na sua fase anamórfica, *Spilocaea pomi*, possui micélio hialino na fase inicial, que vai escurecendo, formando o estroma. A partir deste último, formam-se os conidióforos, na extremidade dos quais se formam os conídios, com 12–22 µm por 6–9 µm (Jones & Aldwinckle, 1990).

Até ao presente, estão identificadas oito raças de *V. inaequalis*, com diferentes níveis de patogenicidade (Gessler *et al.*, 2006).

O principal hospedeiro de *Venturia inaequalis* é a macieira, *Malus domestica*. Dentro desta espécie, existem diferentes níveis de severidade das infecções de pedrado, consoante as

variedades (Gessler *et al.*, 2006). Contudo, para além da macieira, a doença pode infectar outras espécies como *Crataegus* spp., *Sorbus* spp., *Pyracantha* spp. e *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindley (Jones & Aldwinckle, 1990; MacHardy, 1996).

## 2.1. Importância

O pedrado tem elevada repercussão económica, nos pomares de macieiras, na Europa, Ásia e América. É mais importante nas regiões de clima temperado e húmido, sendo menos frequente em regiões semi-áridas (MacHardy, 1996; Agrios, 1997).

O pedrado da macieira foi descrito pela primeira vez na Suécia, por Fries em 1819 (Jones & Aldwinckle, 1990; MacHardy, 1996), mas, provavelmente, o primeiro registo de pedrado, encontra-se no quadro de Caravaggio “A ceia em casa de Emmaus” (Fig. 3 e 4), pintado em 1601 (MacHardy, 1996). Contudo, a ocorrência de pedrado é muito anterior a estes registos, mas era comum e aceite como normal (MacHardy *et al.*, 2001).



**Figura 3** – Quadro “A ceia na casa de Emmaus”, de Caravaggio.

**Figura 4** – Pormenor do quadro de Caravaggio, mostrando lesões de pedrado na maçã.

O pedrado começou a ganhar importância a partir do início do séc. XX quando novas técnicas de fruticultura começaram a adquirir importância na Europa e o cultivo da maçã começou a ganhar expressão (MacHardy *et al.*, 2001).

As lesões provocadas por *Venturia inaequalis* causam perdas económicas ao fruticultor, dada a redução da qualidade na produção, que deixa de ter viabilidade para consumo em

fresco. Os sintomas de pedrado na maçã só são inaceitáveis, porque o mercado impôs altos padrões de qualidade para a fruta.

Os prejuízos podem ser superiores a 70% nas regiões onde existam condições de chuva e humidade nos meses de Primavera (Jones & Aldwinckle, 1990; Agrios, 1997). Na ausência de combate, o pedrado além de provocar perda total da produção conduz à desfoliação e consequente perda de vigor das árvores, que por sua vez, pode restringir a formação de gomos foliares, limitando assim produções seguintes (MacHardy, 1996; Agrios, 1997).

Em Portugal, a existência de temperaturas favoráveis durante a maior parte do período vegetativo, conjugado com a ocorrência de chuvas, determina o desenvolvimento epidémico da doença (Rosa, 1993).

Apenas poucas dos milhares de cultivares de maçã que foram descritas ao longo dos séculos são produzidas extensivamente no presente (Jones & Aldwinckle, 1990). A nível mundial, existem actualmente pouco mais de uma dezena de variedades que representam o global das maçãs comercializadas, juntamente com os seus clones. Estas variedades são todas sensíveis a *V. inaequalis* (Gessler *et al.*, 2006). Contudo, existem actualmente, cerca de uma centena de variedades de macieiras resistentes a *V. inaequalis*, no entanto poucas são de qualidade suficiente para estarem disponíveis nos catálogos dos viveiristas (Gessler *et al.*, 2006).

## **2.2. Sintomas**

Os sintomas de pedrado podem ser observados em folhas, pecíolos, flores, sépalas, frutos, pedúnculos e com menos frequência em jovens rebentos e escamas das gemas. Os sintomas mais visíveis e comuns são os das folhas e frutos (Jones & Aldwinckle, 1990; MacHardy, 1996) (Fig. 5 a 8). Podem ainda surgir lesões na madeira, denominadas pústulas estromáticas (MacHardy, 1996), no entanto, em Portugal, ocorrem mais raramente.

As primeiras infecções podem ocorrer a partir do estado fenológico C3 de Fleckinger (Rosa, 1987), altura em que ficam expostas as primeiras partes verdes da planta, o que corresponde à página inferior das folhas. Deste modo, os primeiros sintomas podem surgir na face inferior das folhas, por serem as primeiras partes expostas numa infecção precoce, mas ocorrem infecções durante todo o desenvolvimento da cultura, em qualquer parte vegetativa.

As lesões têm inicialmente uma tonalidade acastanhada a verde olivácea, com margens irregulares. Com o tempo, as margens ficam mais distintas, e as lesões ficam mais escuras, com uma textura mais aveludada, devido à produção de conídios (Fig. 5 e 6) (Jones & Aldwinckle, 1990; Agrios, 1997).



**Figura 5** – Sintoma de pedrado, logo após rompimento da epiderme pelos conidióforos.

**Figura 6** – Ataque forte de pedrado em folha, com perda significativa de área fotossintética.

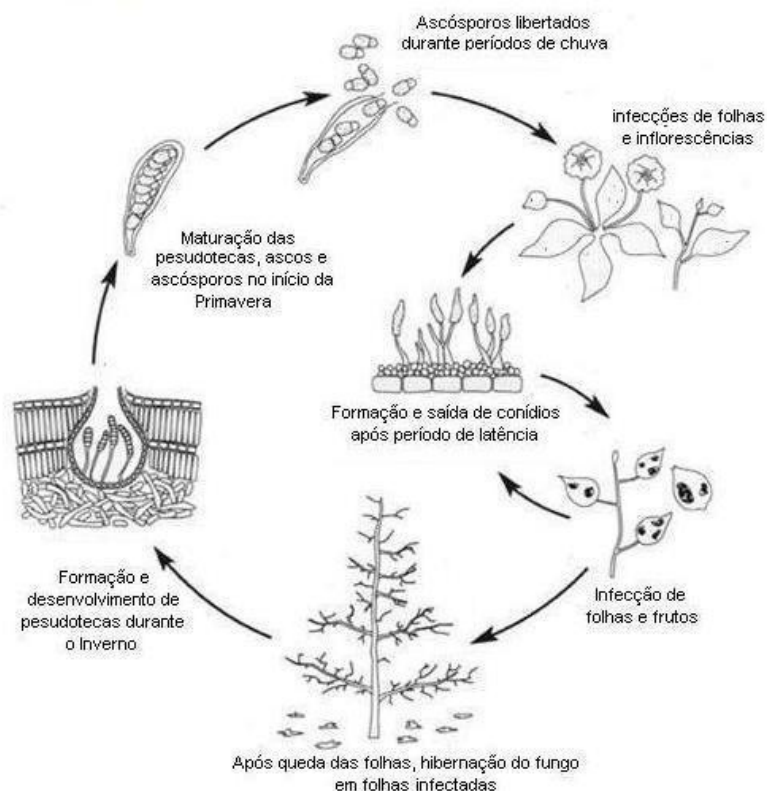
**Figura 7** – Infecções primárias em fruto. Lesões de grandes dimensões.

**Figura 8** – Infecções secundárias de pedrado em fruto.

Os frutos são mais susceptíveis quando jovens e as infecções resultam em lesões maiores (Fig. 7) e, normalmente, levando à distorção dos mesmos. O fim do crescimento nas partes afectadas e a sua continuação nos tecidos envolventes, origina gretas e deformações (Llácer *et al.*, 1996). Em frutos maduros, as lesões são menores e em maior número (Fig. 8). Nestes últimos, as lesões desenvolvem-se mais lentamente, podendo não ser visíveis na altura do armazenamento, aparecendo somente nas câmaras frigoríficas.

### 2.3. Ciclo de vida

O ciclo biológico do agente causador de pedrado (Fig. 9), realiza-se de 2 formas: A forma sexuada, *Venturia inaequalis* e a forma assexuada, *Spilocaea pomi* (Ponti & Laffi, 1988).



**Figura 9** – Ciclo de vida de *Venturia inaequalis* em macieira (adaptado de Wilcox, 2001).

O fungo hiberna, principalmente, na forma sexuada, caracterizada por pseudotecas que se diferenciam nas folhas caídas no Outono (Ponti & Laffi, 1988; MacHardy, 1996). A maior parte das pseudotecas imaturas formam-se 4 semanas após a queda das folhas. Posteriormente, no final do Inverno, após um período de dormência, as pseudotecas prosseguem a sua maturação, desenvolvendo ascos e ascósporos, que amadurecem sequencialmente (Jones & Aldwinckle, 1990).

O fungo pode hibernar também em lesões nos ramos (Jones & Aldwinckle, 1990; MacHardy, 1996), contudo não é uma forma muito comum, principalmente nas condições mais secas de Portugal. Neste caso, as lesões, denominadas pústulas estromáticas, são fontes de inóculo primário na forma de conídios (MacHardy, 1996).



Os ascos amadurecem sucessivamente durante algumas semanas, começando próximo da rebentação e terminando após o período de multiplicação celular dos frutos (MacHardy, 1996). Assim que seja atingida a maturidade dos ascósporos, a ocorrência de chuva determinará a sua libertação e transporte pelo vento até às partes sensíveis das macieiras (MacHardy & Gadoury, 1986). A germinação dos ascósporos e a subsequente penetração na cutícula do hospedeiro, pelo tubo germinativo, está dependente do tempo em que o tecido da planta se mantém humedecido, tendo também, a temperatura um importante papel (MacHardy, 1996).

Após a ocorrência de infecção, ou seja, penetração do tubo germinativo no tecido do hospedeiro, o desenvolvimento de hifas entre a cutícula e a parede das células epidérmicas durante vários dias, resulta no desenvolvimento do estroma e finalmente no desenvolvimento de conidióforos e conídios, que rompem a cutícula. Quando tal ocorre, a lesão torna-se visível a olho nú (MacHardy, 1996). Cada lesão pode produzir 100 000 conídios, prontos a causar novas infecções (Köller *et al.*, 2005).

O período entre a infecção e o aparecimento dos sintomas estará dependente sobretudo da temperatura (MacHardy, 1996), mas a idade do tecido também tem importância, dado o desenvolvimento de resistência ontogénica (MacHardy *et al.*, 2001). A partir do momento em surgem as lesões de pedrado começa a fase assexuada do pedrado. Consecutivas infecções ocorrerão, sempre que existirem condições para tal, até ao Outono, em que, após a abscisão das folhas o fungo volta à sua fase saprófita. Poucos dias até um mês após a queda das folhas, hifas do estroma subcuticular crescem até ao parênquima em paliçada e após fertilização, transformam-se numa pseudoteca imatura (MacHardy *et al.*, 2001).

## **2.4. Condições para o desenvolvimento**

Vários factores favorecem a intensidade e grau de desenvolvimento da doença. Diferentes factores ambientais: pluviosidade, humidade, temperatura, fotoperíodo e período de humectação, apresentam intervalos de variabilidade onde o fungo se desenvolve. Dentro destes intervalos, existe também, uma variabilidade na expressão dos sintomas, conforme o fungo se desenvolva mais próximos dos limites de desenvolvimento, ou próximo do seu óptimo de desenvolvimento (Llácer *et al.*, 1996). Factores como cultivar, quantidade de infecções no ano anterior, data de queda das folhas, temperatura e humidade durante o

Inverno têm efeitos na formação das pseudotecas, na quantidade em que são produzidas e na quantidade destas que atingem a maturidade. Por sua vez, influenciam também a quantidade de ascósporos viáveis no início da Primavera (Gadoury *et al.*, 1984; O'Leary & Sutton, 1986; Jones & Aldwinckle, 1990; MacHardy, 1996) e durante o seu período de libertação (Jones & Aldwinckle, 1990).

Nem todas as pseudotecas se desenvolvem ao mesmo tempo e os ascósporos vão amadurecendo desde antes da macieira ter órgãos susceptíveis de serem infectados (meados de Março) até Junho (Ponti & Laffi, 1988). Os ascósporos continuam a ser libertados até 900 horas (somatório acima de 0°C), após a libertação do primeiro ascósporo, sendo que o período em que poderá ocorrer maior libertação de ascósporos será desde o início até o final de floração (Jones & Aldwinckle, 1990).

Para a ocorrência de infecção, é necessário à existência de um período de pluviosidade, onde a pseudoteca fique completamente molhada, para que os ascos libertem os ascósporos. Com a chuva, os ascósporos são expulsos das pseudotecas a uma altura de 1 a 2 cm acima das folhas, sendo as correntes de ar, responsáveis pelo seu transporte até aos tecidos verdes das macieiras (MacHardy, 1996; Agrios, 1997). Os ascósporos são transportados pelo vento, sendo maioritariamente depositados num raio entre 100 e 200 m da sua origem (MacHardy, 1996). Contudo, alguns ascósporos podem atingir longas distâncias. Hsiang (2000) verificou que os ascósporos de *Venturia inaequalis* têm um raio efectivo de dispersão de 20 m. Por sua vez, Kaplan (1986) refere que a concentração de ascósporos no ar é reduzida em 99% a 5-6 m da sua fonte. Deste modo, é de esperar que a concentração de ascósporos no ar não seja uniforme dentro do mesmo pomar (Charest *et al.*, 2002) e que fontes externas de ascósporos têm muito menor importância que o inóculo existente dentro do próprio pomar, mas tal, depende ainda do tamanho e proximidade da fonte de ascósporos, velocidade do vento, época e intensidade da chuva (Aylor, 1998).

Os ascósporos são libertados em poucos minutos após o início da chuva e, durante o dia, 90% dos ascósporos maduros são libertados nas primeiras 6 horas de um período chuvoso (MacHardy & Gadoury, 1986). Se o período de chuva se mantiver, surgirão pequenos picos de libertação de ascósporos resultantes do seu processo de maturação (MacHardy, & Gadoury, 1986; Gadoury *et al.*, 1992).

Outro factor relevante na descarga dos ascósporos é o facto de ser estimulada pela luz, sendo a maioria libertada durante o dia (Rosa, 1987; Warner & Braun, 1992; MacHardy,



1996; Gadoury *et al.*, 1998). Mais de 95% dos ascósporos são libertados nesse período (MacHardy & Gadoury, 1986; MacHardy & Gadoury, 1989).

A fase de libertação dos ascósporos, deve ser acompanhada e precedida por um período de humectação (folha molhada) suficiente para que os ascósporos germinem e emitam um tubo germinativo que penetre nos tecidos do hospedeiro (Rosa, 1987; Ponti & Laffi, 1988; Agrios, 1997). Essa relação entre horas de humectação, para ocorrência de infecção (Tabela 1) foi inicialmente apresentada por Mills em 1940, que entretanto foi revista e ajustada por diversos autores (MacHardy & Gadoury, 1989; Warner & Braun, 1992), principalmente no que concerne a infecções no período noturno.

Quando a chuva ocorre durante o dia, o período de humectação é calculado desde o início da chuva, mas quando a chuva ocorre durante o período noturno o cálculo do período de humectação é iniciado aquando do início do período de luz, que MacHardy & Gadoury (1986) referem ser das 7:00 às 18:00 e que Warner & Braun (1992) sugerem que seja alargado para das 5:00 às 20:00. Contudo, na falta de ocorrência de chuva no período diurno, quando os ascósporos estão maduros, poderá ocorrer uma importante libertação se essa chuva ocorrer apenas à noite (Gadoury *et al.*, 1998). Também, nos períodos e locais em que exista maturação de ascósporos, mas sem ocorrência de chuva para os libertar, poderá ser suficiente a existência de orvalhos e nevoeiros, para que se possam libertar ascósporos, que levará a infecções, caso ocorram horas de humectação suficientes (Rosa, 1987; Stensvand *et al.*, 1998).

O período de humectação pode não ser contínuo. Os períodos secos, antes de completar o período de humectação, têm uma acção negativa no desenvolvimento da contaminação, dependente do número de horas consecutivas de folhagem seca que se tenha verificado. Assim, 12 horas consecutivas de folha seca com higrometria superior a 85% anulam uma contaminação em curso. Se a higrometria for inferior a 85% bastam 4 horas para anular essa contaminação. Se a higrometria variar durante o período seco, será dado o valor 3 a cada hora de higrometria inferior a 85% e o valor 1 a cada hora de higrometria superior a 85%. Quando o total atingir 12, considera-se anulada a contaminação em curso. Se a folha voltar a ficar molhada antes de se atingir o tempo necessário de folha seca para anular a infecção, retoma-se a soma de horas de humectação sem tomar em conta o período seco (Rosa, 1987). A sobrevivência de ascósporos de *V. inaequalis* em folha seca, por um período superior a 24 h, pode ser assumida como negligenciável (MacHardy, 1996).

**Tabela 1** – Período de humectação necessário para ocorrência de infecções primárias de *Venturia inaequalis*, a diferentes temperaturas médias, e tempo necessário para aparecimento dos sintomas (adaptado de Mills por Jones & Aldwinckle, 1990).

Temperatura (°C)	Período de humectação foliar (horas)			Período de incubação (dias)
	Infecção ligeira	Infecção moderada	Infecção severa	
25,6	13	17	26	
25	11	14	21	
24,4	9,5	12	19	
17,2 – 23,9	9	12	18	9
16,7	9	12	19	10
16,1	9	13	20	10
15,6	9,5	13	20	11
15	10	13	21	12
14,4	10	14	21	12
13,9	10	14	22	13
13,3	11	15	22	13
12,8	11	16	24	14
12,2	11,5	16	24	14
11,7	12	17	25	15
11,1	12	18	26	15
10,6	13	18	27	16
10	14	19	29	16
9,4	14,5	20	30	17
8,9	15	20	30	17
8,3	15	23	35	
7,8	16	24	37	
7,2	17	26	40	
6,6	19	28	43	
6,1	21	30	47	
5,5	23	33	50	
5,0	26	37	53	
4,4	29	41	56	
3,9	33	45	60	
3,3	37	50	64	
2,7	41	55	68	
0,5 – 2,2	48	72	96	

Se a germinação do ascósporo ocorrer com sucesso, uma vez perfurada a cutícula, o fungo diferencia o micélio no espaço intercelular (Ponti & Laffi, 1988; Llácer *et al.*, 1996). Este desenvolvimento leva ao esgotamento e colapso das células da epiderme e do mesófilo. (Agrios, 1997). Esta fase, denominada período de incubação, termina com o aparecimento das manchas características da doença (Ponti & Laffi, 1988) e está, sobretudo, dependente da temperatura. O aparecimento das manchas de pedrado pode ser calculado segundo Mills (Tabela 1), ou através do acumulado de 180° (base 0) das temperaturas médias diárias, desde a infecção (Giraud *et al.*, 1996). As manchas resultam de, na fase final do período de incubação, o micélio diferenciar conidióforos, contendo conídios, acabando por expô-los ao para o exterior da cutícula do tecido infectado da planta, rompendo-a (Agrios, 1997). Esta fase corresponde à diferenciação da estrutura assexuada do pedrado – *Spilocaea pomi*.

Numa lesão, os conídios são produzidos durante, aproximadamente, quatro semanas. Os conídios mantêm-se fixos aos conidióforos enquanto as condições meteorológicas se apresentarem secas, mas após humedecerem desprendem-se com facilidade, sendo libertados para um filme de água que cobre os conidióforos. Se ocorrer chuva, são dispersos pelos salpicos para outras folhas da copa da árvore de origem, geralmente abaixo do ponto de onde se libertaram. A doença irá espalhar-se, principalmente, dentro da copa da árvore infectada. Raramente são detectados conídios no ar para além da zona da copa das árvores de origem (MacHardy, 1996; Agrios, 1997; Aylor & Sanogo, 1997; MacHardy *et al.*, 2001). As condições para infecção por conídios são similares para as infecções por ascósporos (MacHardy, 1996), necessitando apenas dois terços do tempo de humectação dos ascósporos, para que ocorra infecção. O período de vida dos conídios pode ser superior a 2 dias (Aylor & Sanogo, 1997).

Os conídios são os responsáveis pelas infecções secundárias, que irão suceder no restante ciclo anual de desenvolvimento das macieiras, sempre que houver condições meteorológicas.

As folhas e frutos tornam-se mais resistentes ao pedrado, à medida que vão envelhecendo, diminuindo a velocidade de crescimento do fungo. Contudo, o desenvolvimento de novas infecções no Outono pode ser substancial (MacHardy, 1996; Jones & Aldwinckle, 1990; MacHardy *et al.*, 2001).

As infecções terminam no Outono, altura em que, após a queda das folhas, o micélio invade o interior das folhas, formando as pseudotecas, forma hibernante do fungo. Inicialmente, na forma de pseudoteca imatura, evoluindo a sua maturação no final de Inverno/início da Primavera seguinte (Agrios, 1997).

Em Patologia Vegetal, temos que considerar a interação do agente patogénico, hospedeiro e ambiente em que ambos se desenvolvem. Relativamente ao agente patogénico, as populações naturais podem estar compostas por diferentes raças com virulências diferentes. Relativamente à planta cultivada, existem cultivares com diferentes sensibilidades (Llácer *et al.*, 1996), contudo, o valor comercial de cada cultivar, dita principalmente o interesse do fruticultor. O factor ambiente é, sem dúvida, o que adquire maior importância e exige maior atenção do fruticultor.

## 2.5. Monitorização

No final do Inverno, a partir do início de Março, são recolhidas periodicamente folhas que permaneceram no campo sujeitas a condições naturais. As folhas são observadas, em primeiro lugar, à lupa e depois ao microscópio a fim de ser determinado o grau de maturação das pseudotecas, ascos e ascósporos em função da sua coloração. Logo que se observem ascósporos coloridos sabemos que as projecções estão eminentes e dependentes da ocorrência de precipitações (Rosa, 1987).

Antes do período de projecção dos ascósporos, é colocado um capta-esporos, que serve para monitorizar a libertação dos ascósporos com a ocorrência de precipitação. Após ou durante cada período de precipitação, são feitas observações, ao microscópio, das capturas de ascósporos.

A análise da temperatura, precipitação e horas de humectação é efectuada mediante os dados da rede de estações meteorológicas existentes na região, sendo feita a avaliação do risco de infecções.

## 2.6. Meios de luta

Actualmente, não se verificam prejuízos substanciais devido a infecções por *Venturia inaequalis*. Tal só se verifica em anos de grande concentração de chuvas na Primavera, em que a intervenção do fruticultor seja dificultada ou impossibilitada.

Os fungicidas são a principal ferramenta no combate a *V. inaequalis* e são necessárias repetidas aplicações ao longo de cada ano (MacHardy, 1996). Cada vez mais, o factor essencial do combate ao pedrado é a utilização do produto fitofarmacêutico no momento mais oportuno. A determinação desse momento exige o conhecimento, com a máxima exactidão, da relação do ciclo biológico do fungo e da planta hospedeira (Llácer *et al.*, 1996).

O combate aos fungos, cujo micélio se desenvolve no interior das plantas, apresenta alguma dificuldade, já que as janelas de oportunidade do tratamento são, relativamente, curtas (Llácer *et al.*, 1996). Muitos factores condicionam a eficácia dos fungicidas. As características dos produtos fitofarmacêuticos, no que diz respeito à sua forma de actuação,

persistência, resistência à lavagem, entre outros, são essenciais no delineamento de uma estratégia de protecção contra o pedrado.

Podemos considerar dois tipos diferentes de fungicidas: preventivos e curativos (pós-infecção). Os preventivos, como os ditiocarbamatos, a captana, o ditianão e o folpete, cessam o desenvolvimento do fungo, interferindo em inúmeros processos vitais. Este modo de actuação, não específico, determina a forma como estes fungicidas devem ser posicionados. A germinação e penetração no interior dos tecidos da planta podem ocorrer em menos de 1 hora. Após este período, os fungicidas preventivos deixam de ter acção contra o desenvolvimento da doença. Deste modo, e dado o curto intervalo entre início da chuva e a penetração do fungo, devem ser aplicados antes que os esporos cheguem ao tecido da planta. Estes fungicidas de características e acção *multi-site*, com incidência sobre a capacidade de germinação dos esporos, não provocam o aparecimento de linhagens resistentes (Brent & Hollomon, 2007), porque afectam vários processos vitais do agente patogénico, pelo que seriam necessárias diversas alterações genéticas, para produzir uma resistência (Agrios, 1997). Contudo, atacam múltiplas componentes da flora natural, estabelecendo desequilíbrios (Llácer *et al.*, 1996). Deste modo e a partir da década de 60, a tendência tem vindo a evoluir para a utilização de fungicidas mais específicos, concentrando a sua acção no fungo a combater.

O combate às infecções, após o fungo entrar no hospedeiro, só pode ser conseguido com fungicidas que actuem dentro dos tecidos da planta. Estes fungicidas – curativos (pós-infecção) – têm de ser altamente específicos para o fungo, de forma a não provocar efeitos adversos nos tecidos do hospedeiro. Dentro destes fungicidas, encontramos os seguintes, actualmente autorizados em Produção Integrada das Pomóideas: dodina, benzimidazóis (tiofanato-metilo), IBEs – inibidores da biossíntese dos esteróis (bitertanol, difenoconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, miclobutanil e tebuconazol), estrobilurinas (cresoxime-metilo e trifloxistrobina) e anilino-pirimidinas (ciprodinil e pirimetanil). O maior inconveniente da aplicação destes fungicidas específicos, que actuam em processos vitais muito específicos no agente patogénico, é que ocasionam uma pressão de selecção sobre o fungo, induzindo ao aparecimento de isolados resistentes (Llácer *et al.*, 1996; Brent & Hollomon, 2007; Scheneato, 2007)

Existem formas de combater o pedrado de forma indirecta, baseadas na redução do inóculo potencial para o ano seguinte. O método mais comum e mais prático consiste na aplicação

de ureia à queda das folhas. A aplicação de ureia estimula o crescimento de microrganismos, os quais alguns são antagonistas de *V. inaequalis*. O amolecimento das folhas, causado pela ureia, promove uma decomposição mais acelerada por esses microrganismos. A ureia também provoca um aumento de azoto na folha e conseqüentemente uma relação carbono/azoto que inibe a formação das pseudotecas (Carisse *et al.*, 2000). A ureia aplicada no Outono, antes da queda das folhas, ou aplicada ao solo, na folha caída no Outono ou Primavera, tem uma elevada capacidade de reduzir o inóculo de ascósporos (Sutton, 1992; Sutton *et al.*, 2000). Outro método consiste na remoção das folhas do pomar após a sua queda. A destruição das folhas no Outono ou na Primavera, também permite reduzir a quantidade de ascósporos (Sutton *et al.*, 2000). Ainda outro método, que tem efeito na redução na quantidade de ascósporos libertados na Primavera, é a aplicação de calcário sobre as folhas caídas, contudo este método tem menor eficácia que os anteriores (Spotts, 1997).

Os fungos antagonistas *Athelia bombacina* Pers., *Trichoderma* sp. e *Microsphaeropsis* sp., também demonstram bons resultados em aplicação à queda das folhas, na redução dos ascósporos no ano seguinte (Carisse *et al.*, 2000).

## 2.7. Resistência

A resistência é a ocorrência natural e transmitida à descendência, da capacidade de indivíduos de uma população, sobreviver a um determinado fungicida que normalmente proporcionaria um eficaz controlo do fungo (EPPO, 2002).

A gestão do combate a *Venturia inaequalis*, nos últimos 40 anos, demonstra a relevância dos conceitos que Darwin apresentou à cerca de 150 anos. A notável velocidade e os efeitos práticos da adaptação das populações como resposta a alterações no seu ambiente e a dificuldade em parar ou atrasar esses processos são impressionantes. O tamanho das populações é tão grande, que é provável a ocorrência de mutações diariamente (Hollomon & Brent, 2009).

No desenvolvimento de resistências há dois factores de elevada importância – o fungicida e o fungo. Outros factores também têm importância, como o hospedeiro e o fruticultor. No que diz respeito ao fungo, o FRAC refere que *Venturia inaequalis* é um fungo com alto risco de desenvolvimento de resistências. No que diz respeito aos fungicidas, o FRAC

refere que as estrobilurinas têm alto risco de resistências. O ciprodinil apresenta médio risco de resistências e a dodina apresenta baixo risco.

Apesar de *V. inaequalis* causar lesões aparentemente uniformes, a população existente em cada pomar é uma comunidade de diferentes indivíduos com características distintas. Aquando da introdução de um novo fungicida, com novo modo de acção, a maioria dos indivíduos são sensíveis. Contudo, alguns indivíduos irão sobreviver aos tratamentos e vão continuar a multiplicar-se. Estes indivíduos estarão em vantagem, comparativamente com a restante população sensível e a sua preponderância aumentará. Este facto conduzirá ao aparecimento de resistências (Köller *et al.*, 2005a).

O desenvolvimento de resistências foi dividido em respostas quantitativas e qualitativas (Vincelli, 2002). Em geral, as respostas quantitativas são mediadas pela presença de múltiplos genes, cada qual representando um pequeno factor para a resistência. Um genótipo com uma elevada presença destes genes de resistência, que escapar à eliminação, pela aplicação de um determinado fungicida, vai ganhando capacidade competitiva e será seleccionado, aumentando a sua frequência. Contudo, é sensível a aumentos de dose de fungicida. Por outro lado, as respostas qualitativas, pela resistência de um único gene com alto nível de resistência a um fungicida, não permitem o combate à doença a qualquer dose viável do fungicida. A completa falta de controlo conduz a uma rápida selecção de uma subpopulação altamente resistente. A causa de tal resposta qualitativa é, muitas vezes, uma alteração mutacional que anula o local alvo da acção do fungicida (Koller *et al.*, 2004).

A partir de 1950, os fungicidas orgânicos tornaram-se predominantes no combate ao pedrado, substituindo os fungicidas inorgânicos (cobre e enxofre), utilizados quase exclusivamente durante meio século. Na altura não havia evidências que *V. inaequalis* tivesse desenvolvido resistências a fungicidas na natureza (MacHardy, 1996).

A primeira indicação de resistência surgiu em 1969, por Szkolnik & Gilpatrik (1969), que detectaram resistência à dodina. Os casos de resistência sucederam-se, sendo reportados, após fungicidas à base desta substância activa terem sido utilizados extensivamente durante uma década, desde a sua introdução em 1959 (Gilpatrik & Blower, 1973; Ross & Newbery, 1977; Köller *et al.*, 1999). Quando são interrompidas ou reduzidas as aplicações de dodina, verifica-se que os níveis de resistência diminuem (Bakker, 1999; Köller *et al.*, 1999). Contudo, os níveis de resistência podem rapidamente ser repostos se for aumentada a utilização deste fungicida (Köller *et al.*, 1999). Seguidamente a dodina foi sendo

substituída por fungicidas da família dos benzimidazóis, nomeadamente benomil, com resistências a serem reportadas poucos anos após utilização generalizada (Katan *et al.*, 1983; Nothover, 1986; Sholberg *et al.*, 1989). A resistência cruzada entre fungicidas da mesma família era também uma realidade (Köller *et al.*, 2005).

A família dos DMI/IBE (*sterol demethylation inhibitors*/inibidores da biossíntese dos esteróis) foi introduzida nos finais da década de 80 e foi uma solução para o combate a *V. inaequalis* em pomares resistentes a outras famílias de fungicidas, mas logo levantou preocupações (Stanis & Jones, 1985), que vieram a comprovar-se em pouco tempo, por resistência directa ou por resistência cruzada, inclusive em pomares experimentais, antes da sua comercialização (Hildebrand *et al.*, 1988; Köller *et al.*, 1991; Braun & McRae, 1992; Köller *et al.*, 1997; Kunz *et al.*, 1997). Do ponto de vista geral, os IBE, ainda eficazes em muitos pomares, estão gradualmente a perder eficácia (Köller & Wilcox, 2001; Köller *et al.*, 2004).

As estrobilurinas foram uma nova família de fungicidas introduzidas para o combate a *V. inaequalis*, em pomares de macieiras, na Europa, desde 1996 e em pomares experimentais desde 1990 (Kunz *et al.*, 1998). As duas estrobilurinas homologadas para o combate ao pedrado (cresoxime-metilo e trifloxistrobina), foram descritas como sendo eficazes contra os agentes patogénicos e não sendo afectadas por resistências cruzadas com outras famílias de fungicidas. Esta família de fungicidas tem um único local de actuação no fungo, inibindo a respiração mitocondrial, por bloqueio da cadeia bioquímica de transferência de electrões (Ypema & Gold, 1999).

Kunz *et al.* (1998) referem que 27 aplicações em 3 anos e 54 aplicações em 6 anos, em campos de ensaio, não alteraram a sensibilidade de *V. inaequalis* ao cresoxime-metilo. Igualmente, antes da introdução comercial das estrobilurinas, Färber *et al.* (2002) referem que num levantamento da sensibilidade de *V. inaequalis* a fungicidas da família química das estrobilurinas, entre 1995 e 1998, em pomares comerciais da Europa, a maioria das populações eram sensíveis às estrobilurinas. Contudo, estes autores verificaram a presença de conídios resistentes num campo experimental na Suíça, em 1997 e 1999, onde a trifloxistrobina era aplicada desde 1994. Após a sua entrada no mercado, começaram a surgir os primeiros dados de resistências (Olaya & Koller, 1999a; Olaya & Koller, 1999b; Zeng *et al.*, 2000), que indicavam que a resistência a este grupo de fungicidas iria evoluir, constituindo uma quarta ronda de resistência de *V. inaequalis* a fungicidas (Köller &



Wilcox, 2001). Referências à existência de resistência de *V. inaequalis* às estrobilurinas continuam a surgir independentemente da técnica de análise efectuada ou do país (Sallato & Latorre, 2006; Broniarek-Niemiec & Bielenin, 2008). Färber *et al.*, (2002) verificaram que a trifloxistrobina apresentava resistência cruzada com outra estrobilurina, o cresoxime-metilo, mas não com outras famílias químicas, como anilinopirimidinas e triazóis (IBEs).

Wong & Wilcox (2002) referem a possibilidade da existência de inter-relação entre a sensibilidade a fungicidas IBEs e fungicidas do grupo das estrobilurinas, num estudo em oídio da videira [*Uncinula necator* (Schwein.) Burrill]. Contudo, Köller *et al.* (2004) não constataram essa hipótese num estudo realizado em *V. inaequalis*.

Köller *et al.* (2004) documentaram que o desenvolvimento de resistências às estrobilurinas, por parte de *V. inaequalis*, pode-se processar através de uma forma quantitativa, ou através da selecção de uma mutação G143A, conferindo uma resistência qualitativa. Estes mesmos autores referem que se for dado ênfase a aplicações preventivas das estrobilurinas, pode ser esperado um abrandamento no desenvolvimento de resistências quantitativas e qualitativas em *V. inaequalis*. Enquanto que, com os fungicidas IBE, com o desenvolvimento de resistências quantitativas, continua a verificar-se o controlo de populações sensíveis (Köller *et al.*, 1997; Köller & Wilcox, 1999), o desenvolvimento de resistências qualitativas às estrobilurinas, como a mutação G143A (Köller *et al.*, 2004), pode não ser fácil de gerir.

A família das anilinopirimidinas, representadas pelas substâncias activas ciprodinil e pirimetanil para o combate a *V. inaequalis*, foram introduzidos no início dos anos 90. O seu modo de acção é descrito como sendo de acção preventiva, com alguma acção curativa, tendo pouco efeito ao nível da germinação dos esporos (Knauf-Beiter *et al.*, 1995). Actuam ao nível da inibição da secreção de enzimas como cutinases, lipases, invertases e enzimas que conduzem à degradação da parede celular (Kunz *et al.*, 1998). A aplicação das anilinopirimidinas está restrito ao período de pré-floração, dado que a sua eficácia é melhor em folhas que em frutos (Köller *et al.*, 2005).

Kunz *et al.* (1998) verificaram que em ensaios *in vivo*, após 43 aplicações em 4 anos, não foram detectadas alterações da sensibilidade de *V. inaequalis* aos fungicidas da família das anilinopirimidinas. Contrariamente, Kung *et al.* (1999), em ensaio experimental com elevada exposição ao ciprodinil, verificaram que podia haver redução de sensibilidade de *V. inaequalis*. Referem, contudo, que o ciprodinil não apresenta resistências cruzadas com

IBE ou estrobilurinas, apesar de ter com outras anilino-pirimidinas. Dados mais recentes, já referem a existência de resistências de *V. inaequalis* às anilino-pirimidinas (Schwabe, 2006).

A substituição de uma família de fungicidas por outra, implica que não existam resistências cruzadas entre essas famílias. Durante algum tempo, pensou-se que não existia resistência cruzada entre dodina, benzimidazóis e IBE. No entanto, estudos recentes mostram que alguns mecanismos de resistência podem não ser totalmente independentes (Köller & Wilcox, 1999; Köller & Wilcox, 2000), dado parecer existir evidência de efeitos interactivos entre dodina e IBE. Os mesmos autores, num estudo posterior (Köller & Wilcox, 2001) demonstraram existir uma forte evidência de que a resistência a uma classe de fungicidas pode acelerar a velocidade das mutações para uma resistência a outra classe de fungicidas. Isto pode significar que um dos diversos mecanismos que confere resistências a uma determinada classe de fungicida, pode também conferir resistência a outra classe com outro modo de acção. Este facto foi demonstrado para dodina, benzimidazóis e IBE.

Fungicidas cujo aparecimento de resistências levou à perda de eficácia não se tornam inúteis, podendo continuar a ser utilizados, por exemplo, mediante misturas com fungicidas de largo espectro (Agrios, 1997). Com os IBEs, parece funcionar a mistura com um fungicida multi-site para reduzir a pressão de selecção e consequentemente a velocidade de desenvolvimento de resistências (Köller & Wilcox, 1999). Contudo, Turechek & Köller (2004) não verificaram essa evidência na mistura de mancozebe com uma estrobilurina.

O FRAC refere que a pressão de *V. inaequalis*, na Europa, é baixa a moderada, referindo que a frequência de resistência em 2008 foi: moderada a alta no Sul de França, Norte de Itália (excepto no Alto Ádige), Polónia, Grécia e Alemanha Oriental; moderada a baixa na Bélgica e Alemanha Ocidental; baixa em Itália (Trentino e Alto Ádige), Reino Unido, Espanha e Portugal. O FRAC, não detectou resistências na Áustria, norte de França (Vale do Loire) e Alemanha (Lago Constância).

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Ensaio de campo

##### 3.1.1. Os pomares

Os ensaios de eficácia de fungicidas realizados em campo, para o combate a *Venturia inaequalis*, tiveram lugar em dois pomares, localizados na região da Cova da Beira, representando diferentes pressões de infecção:

- Pomar de meia-encosta, sem historial de infecções de pedrado. Neste pomar são aplicadas estrobilurinas, desde a sua homologação, com uma média inferior a 1,5 aplicações por ano. Este pomar foi denominado “*pomar de baixo risco*”. O pomar tem 15 anos de idade, um compasso de 4,5 x 2 m, altura média de 2,5 m, conduzido em eixo central revestido, com baixa densidade de folhagem (Fig. 10). O ensaio foi realizado na variedade RedChief.
- Pomar em zona de baixa, sob influência de um microclima húmido, junto a uma linha de água, com historial de infecções de pedrado. Este pomar tem um historial de infecções de pedrado desde 2003, por razões não clarificadas. Neste pomar têm sido aplicadas estrobilurinas, desde a sua homologação, com uma média de 2 tratamentos por ano. Para esta média, pesam sobretudo a quantidade de estrobilurinas aplicadas no início desta década, dado que em 2007 e 2008, apenas foram aplicadas uma vez por ano. Este pomar foi denominado “*pomar de alto risco*”. O pomar tem 10 anos. Tem um compasso de 4 x 1 m, altura média de 3,5 m, conduzido em eixo central revestido, com alta densidade de folhagem (Fig. 11). O ensaio foi realizado na variedade Fuji.

Neste ensaio não se pretendeu realizar comparações de eficácia entre pomares, dado que estão e estiveram sujeitos a diferentes pressões de infecção, nomeadamente no que concerne ao número de estrobilurinas aplicadas, às condições de desenvolvimento do pedrado e a factores culturais. Pretendeu-se, dentro de cada pomar verificar a sensibilidade das populações de *V. inaequalis* às estrobilurinas.



**Figura 10** – Tratamento a ser efectuado numa modalidade do pomar de baixo risco. Aspecto da densidade vegetativa das macieiras.

**Figura 11** – Aspecto da densidade vegetativa no pomar de alto risco.

### 3.1.2. Modalidades

O ensaio foi constituído por quatro modalidades: a testemunha onde se aplicou água sem fungicida; duas modalidades onde foram aplicadas as duas estrobilurinas homologadas para o combate a *Venturia inaequalis*, cresoxime-metilo e trifloxistrobina; uma modalidade tratada com dodina, servindo como tratamento de referência, de outra família química, com um período curativo e preventivo similar às estrobilurinas, que tem um reduzido historial de aplicações na região e que apresenta baixo risco de resistência. As doses utilizadas foram as preconizadas para o combate ao pedrado pelas casas comerciais (Tabela 2).

**Tabela 2** – Modalidades do ensaio de campo realizadas no pomar de alto risco e no pomar de baixo risco, para verificar a eficácia de fungicidas contra infecções por *Venturia inaequalis*.

Modalidade/Família Química	Substância activa	Concentração (g ou ml/hl)
Testemunha	-	-
Estrobilurina	trifloxistrobina	100 g
Estrobilurina	cresoxime-metilo	200 g
Guanidina	dodina	225 ml

### 3.1.3. Execução do ensaio

A aplicação dos fungicidas foi feita com recurso a um pulverizador de dorso de jacto projectado, modelo Rocha F320 (Fig. 10). No início da campanha, foi feita a calibração do pulverizador, mediante a realização de um ensaio em branco, em cada pomar, utilizando papéis hidro-sensíveis para avaliar e ajustar a qualidade da pulverização. Nos tratamentos seguintes, foram colocados papéis hidro-sensíveis a fim de confirmar a qualidade da pulverização.

Os tratamentos foram realizados, nas datas apresentadas na Tabela 3, posicionados preventivamente, quando existiram condições para infecções de pedrado, seguindo as previsões meteorológicas para a região. Para confirmar os períodos de infecção e calcular o período de incubação, foram utilizados os dados meteorológicos de estações próximas dos locais de ensaio, nomeadamente, temperatura máxima, mínima e média, precipitação e horas de humectação. Nas Figuras 12 e 13 apresentam-se os dados das condições meteorológicas no período de ensaio. A avaliação dos períodos de infecção e períodos de incubação, foram analisados com base nos critérios de Mills.

**Tabela 3** – 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

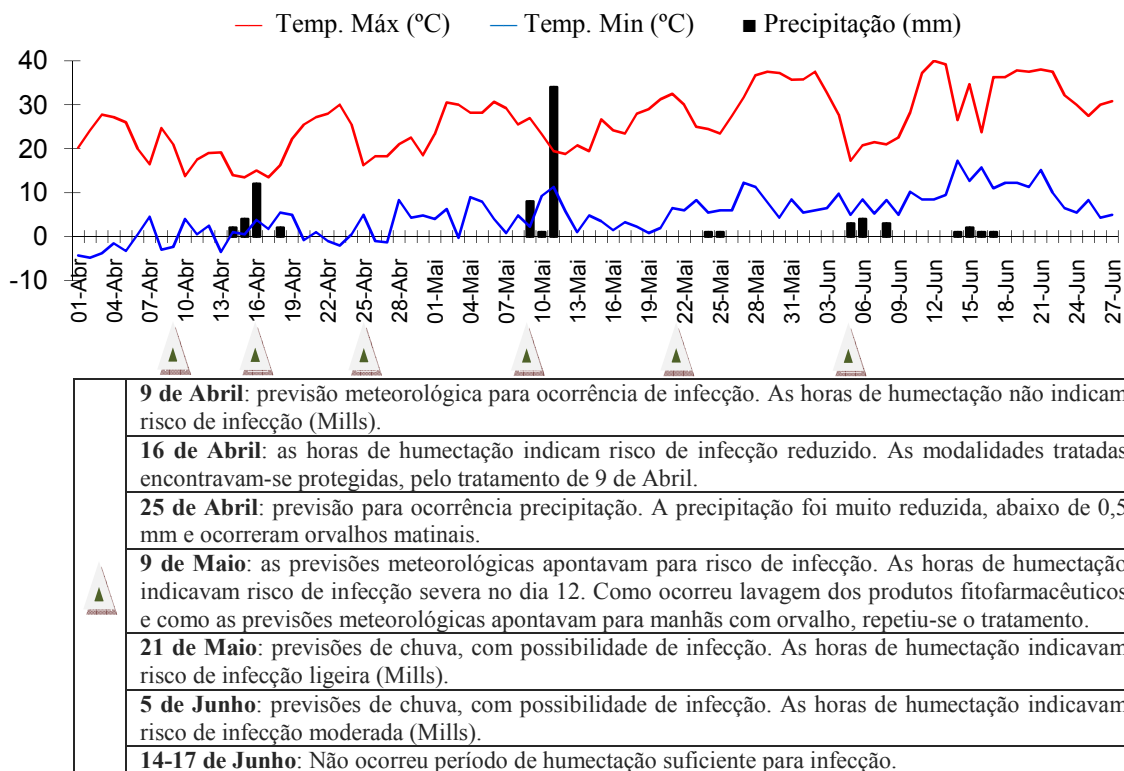
(a) - Tratamento realizado pelo fruticultor em toda a zona de ensaio com cresoxime-metilo.

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

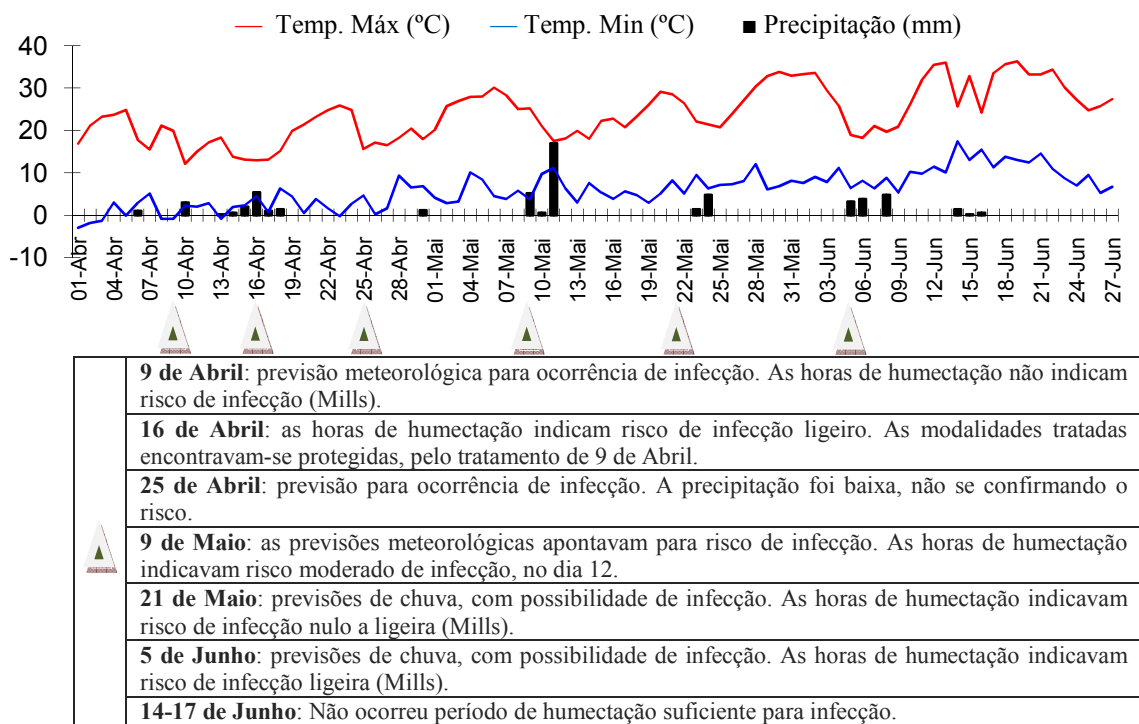
V - Tratamento efectuado.

### 3.1.4. Amostragem

A amostragem consistiu na observação e avaliação de 200 folhas por parcela, ou seja 50 folhas por árvore, nos diferentes quadrantes e alturas da árvore. As observações de folhas iniciaram aquando da data do surgimento das lesões provocadas pelo primeiro período de infecção (EPPO, 2004), a 16 de Abril (Fig. 12 e 13). Essa observação foi a 7 de Maio. A segunda observação, realizada a 19 de Maio, pretendeu verificar a existência de infecções, num período de risco nulo a baixo, ocorrido no final de Abril.



**Figura 12** – Dados da estação meteorológica próxima do pomar de alto risco e descrição das condições para infecção de pedrado.



**Figura 13** – Dados da uma estação meteorológica que representa as condições meteorológicas ocorridas no pomar de baixo risco.

Foi realizada nova observação, a 26 de Junho, correspondente ao final das infecções por ascósporos (infecções primárias). Nesta observação, pretendeu-se ver o efeito das infecções ocorridas em três períodos: 10 e 11 de Maio; 24 e 25 de Maio e 6 de Junho (Fig. 12 e 13). Foi ainda, realizada uma observação próximo da colheita.

A avaliação de infecções no fruto foi realizada à colheita. A avaliação de frutos foi feita em 100 frutos, por parcela, ou seja 25 frutos por macieira nos diferentes quadrantes e alturas (EPPO, 2004).

### **3.1.5. Delineamento experimental e análise estatística**

Foi realizado um delineamento em blocos completamente aleatórios. Cada parcela foi constituída por seis árvores, com quatro repetições (EPPO, 2004; EPPO, 2007), mas só as quatro árvores centrais foram utilizadas para as observações.

Os dados das amostragens foram analisados pelo teste Shapiro-Willk, para verificar quanto à normalidade da sua distribuição. Os dados das amostras contendo exclusivamente zeros influenciavam negativamente a homogeneidade de variância do conjunto de dados analisados, contudo, os dados foram submetidos a uma análise de variância (OneWay – Anova), por esta apresentar robustez suficiente para suportar o não cumprimento deste pressuposto. 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.

## **3.2. Ensaio *in vitro***

O ensaio *in vitro* pretendeu avaliar, em laboratório, a germinação de conídios, provenientes de três origens com distintos níveis de risco de resistências.

### **3.2.1. Origem do material vegetal**

A proveniência das folhas com lesões de pedrado, de onde se extraíram os conídios para os ensaios de germinação foi de três localizações, que representavam pressões distintas aos tratamentos com estrobilurinas:

- pomar de alto risco, localizado numa zona com grande pressão para infecções de pedrado, nomeadamente horas de humectação, que esteve sujeito a elevada pressão de tratamentos com estrobilurinas e com historial de infecções de pedrado. Este pomar corresponde ao mesmo onde foi realizado o ensaio de campo, com a denominação pomar de alto risco. As folhas com lesões foram recolhidas de árvores onde não foram aplicados fungicidas este ano.
- pomar de baixo risco, localizado numa zona de menor pressão de pedrado, por ter uma boa drenagem atmosférica e onde os tratamentos com estrobilurinas têm sido efectuados em baixa quantidade. Este pomar corresponde ao mesmo onde foi realizado ensaio de campo, com a denominação pomar de baixo risco. As folhas com lesões foram recolhidas de árvores onde não foram aplicados fungicidas este ano.
- zona não frutícola, localizada fora de zona de fruticultura, sem pomares nas freguesias vizinhas e sem historial de aplicação de estrobilurinas e dos restantes fungicidas testados, ciprodinil e dodina. São macieiras de quintal, onde a presença de lesões de pedrado é aceite pelo proprietário. Os únicos tratamentos reportados foram com fungicidas preventivos (ditiocarbamatos e ftalimidas). Este representa a população sensível aos fungicidas testados.

As folhas com lesões de pedrado foram colhidas entre 5 e 19 de Junho. As amostras de cada localização consistiram em cerca de 40 a 60 folhas com lesões esporuladas de pedrado. As folhas foram transportadas para o laboratório entre folhas de jornal, em arca frigorífica portátil, no mesmo dia da recolha.

### **3.2.2. Fungicidas testados**

Os fungicidas testados no ensaio *in vitro*, foram as duas estrobilurinas homologadas para o pedrado (cresoxime-metilo e trifloxistrobina), para as quais a metodologia utilizada está recomendada pelo FRAC (Stammler & Klappach, 2006). Foram ainda testadas as substâncias activas dodina, também utilizada no ensaio de campo, e ciprodinil. Esta última, não foi testada em campo, dado que a sua recomendação de aplicação restringe-se até à floração e os períodos de risco de infecção de pedrado foram posteriores a este estado fenológico. A introdução de ciprodinil e dodina no ensaio *in vitro* tiveram em vista a verificação da adaptação da técnica utilizada para estas substâncias activas, dado ser de



fácil execução e de resposta rápida. No entanto, a metodologia utilizada não está recomendada pelo FRAC para estas substâncias activas.

Os fungicidas foram diluídos em agar-água esterilizado. A concentração final dos fungicidas, no meio de cultura, foi de 2 ppm de substância activa. O meio de cultura foi colocado em placas de Petri, cada uma com 20 ml. As modalidades do ensaio estão representadas na Tabela 4.

**Tabela 4** – Modalidades do ensaio *in vitro* para verificar a germinação de conídios de pedrado, para cada uma das proveniências, pomar de alto risco, pomar de baixo risco e zona não frutícola.

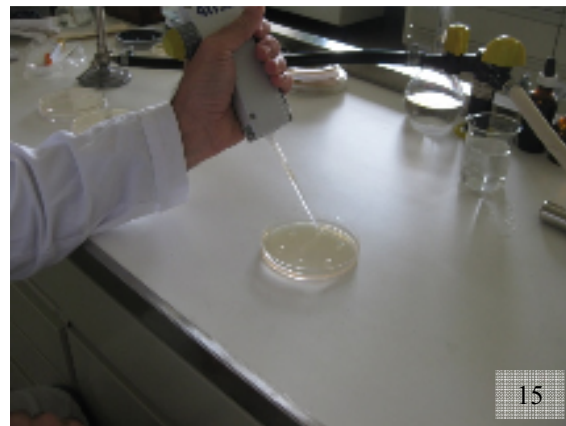
Modalidade/Família Química	Substância activa
Testemunha	—
Estrobilurina	trifloxistrobina
Estrobilurina	cresoxime-metilo
Guanidina	dodina
Anilinopirimidina	ciprodinil

### 3.2.3. Produção de inóculo

Foi seguido o procedimento descrito pelo FRAC (Stammler & Klappach, 2006). Foram recortadas, com um *corkborer* de 6 mm de diâmetro, 60 porções de folhas infectadas com *Venturia inaequalis*, provenientes de 40 a 60 lesões (Fig. 14). As porções de folhas foram colocadas num balão de Erlenmeyer com 10 mL de água destilada esterilizada, em agitação. A solução foi filtrada através de quatro camadas de gaze esterilizada, para remover impurezas. A concentração de conídios foi verificada, utilizando uma câmara de Neubauer, sendo a concentração final determinada e ajustada para aproximadamente  $5 \times 10^5$  conídios/mL.

### 3.2.4. Inoculação

Foram colocadas 12 gotas de 10  $\mu$ L das suspensões de esporos no meio de cultura, seis em cada placa de Petri (Fig. 15), correspondendo a um total de 12 repetições para cada modalidade. A área das gotas foi marcada com caneta de acetato. As placas de Petri foram colocadas a incubar a 18-20°C, sem luz, durante 24 horas.



**Figura 14** – Destacamento de lesões de *V. inaequalis* das folhas.

**Figura 15** – Inoculação da suspensão de conídios em meio de cultura.

### 3.2.5. Observação

Após o período de incubação, foram contabilizados ao microscópio (400X), os conídios germinados em 100 esporos, em cada uma das 12 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 foi determinada a 0 ppm [(n.º de conídios germinados/total de conídios contabilizados)x100]. A percentagem de conídios resistentes foi determinada por [(percentagem de conídios germinados a 2 ppm/percentagem de conídios germinados a 0 ppm)x100].

### 3.2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi completamente aleatório, composto por 12 repetições, correspondentes a 12 inoculações com gotas de 10 µL, nos quais se contaram 100 conídios.

Os dados foram analisados pelo teste Shapiro-Willk, para verificar quanto à normalidade da sua distribuição. Os dados das amostras contendo exclusivamente zeros, influenciavam negativamente a homogeneidade de variância do conjunto de dados analisados, contudo, os dados foram submetidos a uma análise de variância (OneWay – Anova), por esta apresentar robustez suficiente para suportar o não cumprimento deste pressuposto. 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.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Ensaio de campo

No decorrer do ciclo cultural, verificou-se, tal como já se tinha conhecimento, que os dois pomares onde se efectuaram os ensaios de campo estão sujeitos a diferentes pressões de infecções de pedrado.

A maturação dos ascos e ascósporos começou no início de Abril, mas teve o seu máximo em finais de Abril. O início projecção de ascósporos ocorreu a 14 de Abril.

#### 4.1.1. Avaliação de folhas com pedrado

##### Pomar de alto risco

A contagem das primeiras infecções, a 7 de Maio, resulta da saída de manchas de infecções de pedrado, ocorridas nas precipitações de 16 de Abril, com risco de infecção reduzido. Estas infecções ocorreram quando a área de ensaio e o pomar em geral, estava protegido de infecções com uma aplicação, feita pelo agricultor, com cresoxime-metilo. Apesar de bem posicionado, a eficácia do tratamento revelou uma possível falha do fungicida cresoxime-metilo. A existência de lesões de pedrado, nesta data, deu ênfase à suspeita de perda de sensibilidade da população de *Venturia inaequalis* às estrobilurinas.

O ensaio de campo iniciou-se com a existência de infecções primárias que variaram entre 2,6% e 3,3% das folhas (Tabela 5), mas não existindo diferenças significativas entre as modalidades.

**Tabela 5** – Percentagem de folhas com pedrado, no pomar de alto risco, nas diferentes datas de observação em 2009 (resumo da Tabela anexo 1-4).

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

Nota: números seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (teste de Duncan).

A 19 de Maio foi realizada uma observação, onde se pretendeu verificar se o período de infecções de risco ligeiro ou nulo, ocorrido em finais de Abril, teria provocado infecções. Esta avaliação revelou que ocorreram infecções nesse período, com diferenças significativas entre modalidades (Tabela 5). A modalidade testemunha, apresentou maior número de folhas com pedrado, diferindo significativamente da modalidade com aplicação de dodina, mas não diferindo significativamente das modalidades com aplicação de estrobilurinas (cresoxime-metilo e trifloxistrobina). Entre as modalidades tratadas, não se verificaram diferenças significativas, embora, na modalidade tratada com dodina a quantidade de folhas com pedrado fossem menos de metade das verificadas nas modalidades tratadas com estrobilurinas. Os resultados obtidos nesta observação vieram dar maior relevância às suspeitas de perda de sensibilidade da população de *V. inaequalis* às estrobilurinas, inclusive em períodos de baixo risco de infecção.

A observação realizada a 26 de Junho corresponde ao final das infecções por ascósporos (infecções primárias). Nesta observação, pretendeu-se ver o efeito das infecções ocorridas em três períodos. Um período de infecções ocorrido a 10 e 11 de Maio, com risco de infecção severa, outro período ocorrido a 24 e 25 de Maio, com risco de infecção ligeira, e outro período de infecção a 6 de Junho, com risco de infecção moderada. Todos estes períodos foram precedidos pela aplicação dos fungicidas nas modalidades tratadas do ensaio. Nesta observação, verificaram-se três grupos distintos de gravidade de infecções (Tabela 5). A modalidade testemunha, apresentou um elevado número de folhas com pedrado (26,9%), diferindo significativamente das restantes modalidades. As modalidades tratadas com estrobilurinas apresentaram uma percentagem de folha com lesões, inaceitáveis, num pomar comercial, em que a modalidade tratada com cresoxime-metilo tinha 17,9% de folhas com pedrado e a modalidade tratada com trifloxistrobina tinha 19,3% de folhas com lesões de pedrado. Entre estas duas modalidades não se verificaram diferenças significativas. A modalidade tratada com dodina mostrou-se a mais eficaz no combate ao pedrado, com 3,9% de folhas com lesões, diferindo significativamente das modalidades tratadas com estrobilurinas e da testemunha. Nesta observação, já não restavam dúvidas da ineficácia das estrobilurinas, no combate à população de pedrado, existente no pomar de alto risco.

Após a observação a 26 de Junho, ocorreram condições meteorológicas para a ocorrência de infecções secundárias de pedrado. A partir dessa data, o ensaio foi tratado pelo

fruticultor da mesma forma como fez na restante área do pomar, que também apresentava infecções de pedrado. Foram feitas aplicações com difenoconazol a 30 de Junho e ditianão a 22 de Julho. Contudo, outros períodos de risco de infecção, sobretudo devidos a períodos de humectação mais prolongados, como consequência de orvalhos matinais, continuaram a ocorrer.

A última observação das folhas foi realizada próximo da colheita. Pelo descrito anteriormente, esperava-se um nível de infecção elevado. As diferenças entre modalidades existentes na observação realizada após o final de projecção de ascósporos mantiveram-se (Tabela 5). A testemunha apresentou 72,6% de folhas com lesões de pedrado, diferindo significativamente das restantes modalidades. As modalidades tratadas com cresoxime-metilo e trifloxistrobina apresentaram 52,3% e 50,4% de folhas com lesões de pedrado, respectivamente. Estas duas modalidades não apresentaram diferenças significativas entre si, mas diferiam significativamente da testemunha e da dodina. A modalidade tratada com dodina apresentava 4,3% de folhas com lesões de pedrado, muito abaixo das restantes modalidades, para as quais apresentava diferenças significativas. Verificou-se a não existência de contaminações de pedrado entre parcelas do ensaio, o que corrobora a teoria de que as infecções secundárias de pedrado, ocorrem sobretudo na mesma árvore de origem (MacHardy, 1996; Agrios, 1997; Aylor & Sanogo, 1997; MacHardy *et al.*, 2001).

Neste pomar, onde as estrobilurinas são aplicadas ininterruptamente desde a sua homologação em Portugal (1998), verificou-se a perda de sensibilidade de *V. inaequalis*. Esta perda de sensibilidade é de tal forma elevada, que mesmo em períodos de infecção ligeira, as estrobilurinas não têm eficácia no combate ao pedrado. Quando comparadas com a modalidade onde foi aplicada dodina existe uma enorme discrepância. A modalidade dodina, tal como as restantes, iniciou com infecções de pedrado, na sequência da falta de eficácia de um tratamento realizado pelo agricultor, com uma estrobilurina. Se tal não tivesse ocorrido, a dodina, provavelmente, teria proporcionado um controlo eficaz do pedrado.

### **Pomar de baixo risco**

No pomar de baixo risco praticamente não se verificaram infecções de pedrado, incluindo a modalidade não tratada com fungicidas. Este pomar, além de não ter histórico de infecções

de pedrado, que resulta numa baixa quantidade de inóculo na forma de ascósporos nas folhas caídas no solo, possui condições meteorológicas menos propícias a infecções, nomeadamente horas de humectação, quando comparado com o pomar de alto risco.

A primeira observação de folhas foi realizada a 7 de Maio, para verificar as primeiras infecções, que resultaram de chuvas ocorridas a 16 de Abril, que representaram um risco de infecção ligeiro. Nesta observação não se verificou quaisquer infecções de pedrado, em todas as modalidades (Tabela 6). Deste modo, o risco ligeiro de infecção, associado ao reduzido inóculo do pomar, não causaram infecções.

**Tabela 6** – Percentagem de folhas com pedrado, no pomar de baixo risco, nas diferentes datas de observação, em 2009 (resumo da Tabela anexo 5-8).

<b>Modalidade</b>	<b>7 Maio</b>	<b>19 Maio</b>	<b>26 Junho</b>	<b>Colheita</b>
Testemunha	0	0	2,5 a	3,5 a
cresoxime-metilo	0	0	0,5 b	1,0 b
trifloxistrobina	0	0	0,5 b	0,5 b
dodina	0	0	0 b	0 b

Nota: números seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (teste de Duncan).

A segunda observação, realizada a 19 de Maio, confirmou a não existência de infecções, no período de chuvas ocorridas no final de Abril, pelo que, nenhuma das modalidades apresentava lesões de pedrado (Tabela 6).

A observação realizada a 26 de Junho corresponde ao final das infecções por ascósporos (infecções primárias). Nesta observação, pretendeu-se ver o efeito acumulado de infecções ocorridas em três períodos. Um período de infecções ocorrido a 10 e 11 de Maio, com risco de infecção moderada, outro período ocorrido a 24 e 25 de Maio, com risco de infecção nulo a ligeira, e outro período de infecção a 6 de Junho, com risco de infecção ligeira. Todos estes períodos foram precedidos pela aplicação de fungicidas nas modalidades tratadas do ensaio. Nesta observação verificaram-se lesões de pedrado nas folhas (Tabela 6). Na modalidade testemunha, verificaram-se 2,5% de folhas com lesões. É um valor baixo, para os períodos de infecções que ocorreram, que se deve ao facto da baixa quantidade de inóculo, na forma de pseudotecas nas folhas do solo, resultado da não existência de histórico de infecções de pedrado. Nas modalidades tratadas, verificou-se a

existência de 0,5% de folhas com lesões de pedrado nas modalidades tratadas com trifloxistrobina e cresoxime-metilo e 0% de folhas com lesões de pedrado na modalidade tratada com dodina. Apesar da baixa incidência de pedrado, verificaram-se diferenças significativas entre a modalidade não tratada e as modalidades tratadas. Entre as modalidades tratadas, não se verificaram diferenças significativas. Contudo é de salientar a existência de folhas com pedrado nas modalidades tratadas com estrobilurinas, enquanto na modalidade tratada com dodina, tal não ocorreu.

Após a observação de folhas realizada no final da projecção de ascósporos, não se efectuaram mais tratamentos no ensaio e no pomar em geral, dado que não houveram condições meteorológicas que o justificassem.

Na observação realizada à colheita, as percentagens de folhas com lesões de pedrado, nas modalidades tratadas, continuavam a apresentar-se muito baixas (Tabela 6). A testemunha aumentou ligeiramente a percentagem de folhas com pedrado, tendo sido contadas 3,5% de folhas com pedrado. A modalidade tratada com cresoxime-metilo, aumentou para 1% de folhas com pedrado. Tal como na observação anterior não se verificaram diferenças significativas entre as modalidades tratadas e estas apresentavam diferenças significativas, somente quando comparadas com a testemunha.

#### **4.1.2. Avaliação de frutos com pedrado**

Foi realizada uma avaliação de frutos com pedrado à colheita. Essa avaliação evidenciou uma clara diferença entre o pomar de alto risco e o pomar de baixo risco, dado que representam realidades micro-climáticas, culturais e de pressão de pedrado distintas.

##### **Pomar de alto risco**

O tipo de lesões observado era variável, com uma mistura de infecções primárias – lesões únicas e de grandes dimensões – e infecções secundárias – pequenas e em maior número.

À colheita, os frutos com pelo menos uma lesão de pedrado eram muito elevados na modalidade testemunha e nas modalidades tratadas com as duas estrobilurinas (Tabela 7), não havendo diferenças significativas. Na modalidade testemunha, 62,8% dos frutos apresentavam lesões de pedrado e as modalidades tratadas com cresoxime-metilo e

trifloxistrobina, apresentavam 47,8% e 55,3% de frutos com lesões de pedrado, respectivamente. A modalidade tratada com dodina, apresentou 2,3% de frutos com pedrado, muito abaixo das restantes modalidades das quais difere significativamente. Estes dados estão em consonância com o que foi verificado ao nível das lesões nas folhas, em que as estrobilurinas, não têm capacidade de combater o pedrado no pomar de alto risco, resultado da baixa sensibilidade da população de *V. inaequalis* a esta família de fungicidas.

**Tabela 7** – Percentagem de frutos com pedrado à colheita, no pomar de alto risco, em 2009 (resumo da Tabela anexo 9).

<b>Modalidade</b>	<b>Frutos com infecções de pedrado (%)</b>
Testemunha	62,8 a
cresoxime-metilo	47,8 a
trifloxistrobina	55,3 a
dodina	2,3 b

Nota: números seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (teste de Duncan).

### **Pomar de baixo risco**

Tal como verificado ao nível das folhas, o pedrado em frutos não tem uma grande expressão neste pomar (Tabela 8). A testemunha, apenas apresentava 1,8% de frutos com lesões de pedrado. Nas modalidades tratadas verificou-se 0% de frutos com pedrado nas modalidades tratadas com trifloxistrobina e dodina e 0,5% na modalidade tratada com cresoxime-metilo. Entre as modalidades tratadas não existiram diferenças significativas. Contudo e apesar do baixo número de infecções, as modalidades tratadas diferiram significativamente da testemunha.

**Tabela 8** – Percentagem de frutos com pedrado à colheita, no pomar de baixo risco, em 2009 (resumo da Tabela anexo 10).

<b>Modalidade</b>	<b>Frutos com infecções de pedrado (%)</b>
Testemunha	1,8 a
cresoxime-metilo	0,5 b
trifloxistrobina	0 b
dodina	0 b

Nota: números seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (teste de Duncan).



## 4.2. Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* revelam duas realidades. A primeira diz respeito às estrobilurinas (cresoxime-metilo e trifloxistrobina) que apresentam grandes diferenças em função da proveniência dos conídios, revelando a existência de resistências. A segunda, diz respeito à dodina e ao ciprodinil que não apresentaram dados de germinação que permitissem retirar quaisquer conclusões (Tabela 9).

O procedimento efectuado, está adaptado para a monitorização de resistências às estrobilurinas, pelo FRAC (Stammler & Klappach, 2006), contudo não está para as restantes famílias. Não obstante, pretendeu-se testar o mesmo procedimento para outras substâncias activas, dado ser uma metodologia simples e de rápido resultado, representando uma ferramenta muito interessante.

**Tabela 9** – Percentagem de conídios resistentes nas diferentes modalidades com referência à testemunha (100%), para as três origens dos conídios (Resumo da Tabela anexo 11-25).

Origem dos conídios	Testemunha	cresoxime-metilo	trifloxistrobina	dodina	ciprodinil
Pomar alto risco	100	94,9 a	97,3 a	0 a	46,4 a
Pomar baixo risco	100	33,5 b	33,5 b	0 a	28,3 b
Zona não frutícola	100	0 c	0 c	0 a	49,5 a

Nota: números seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (teste de Duncan).

Os dados relativos às inoculações com dodina, não permitem tirar qualquer conclusão, dado que não ocorreu germinação de conídios, independentemente da origem das infecções de pedrado – pomar de alto risco, pomar de baixo risco e zona não frutícola. Poder-se-ia supor uma eficácia total na inibição de germinação dos conídios de todas as proveniências. Contudo, Broniarek-Niemiec & Bielenin (2008) e Meszka *et al.* (2008), utilizando o mesmo método com dodina a 1 ppm, obtiveram germinação de conídios, levando a supor que, o facto de no presente estudo, ter sido utilizada uma concentração de fungicida de 2 ppm, no seguimento da metodologia utilizada para as estrobilurinas, poderá ter sido em excesso e conduziu à inibição da germinação em todas as modalidades. Broniarek-Niemiec & Bielenin (2008) e Meszka *et al.* (2008) verificaram populações resistentes a esta substância activa, em pomares da Polónia e realçam a probabilidade da resistência poder

persistir na população, por longos períodos, podendo reincidir em resposta a pequena pressão de aplicação desta substância activa. Meszka *et al.* (2008) referem que apesar do decréscimo de utilização da dodina para uma a duas aplicações anuais, desde 2001, após um período de cinco aplicações por ano a resistência mantém-se. No presente trabalho, não se esperava encontrar resistências a esta substância activa, dado que a sua aplicação é muito reduzida, na região. No pomar de alto risco a dodina tem sido aplicada, no período pré-floração, no máximo de uma aplicação por ano. No pomar de baixo risco, a dodina não tem sido aplicada. A resistência de *V. inaequalis* à dodina tem sido reportada onde a sua aplicação ocorreu de forma repetida em cada ciclo de vida do pedrado e continuada durante vários anos (Gilpatrick & Blower, 1973; Ross & Newbery, 1977). Onde a pressão dos tratamentos com dodina foi baixa, não têm sido reportados casos de resistência (Bakker *et al.*, 1995; Bakker, 1999; Köller *et al.*, 1999). Contudo, a sua introdução, no mercado, com uma nova formulação líquida e o facto de poder ser uma alternativa à perda de eficácia das estrobilurinas, em alguns pomares, poderá levar ao aumento da sua utilização. A revisão da directiva 91/414, levanta a hipótese da saída de substâncias activas com acção curativa, nomeadamente os IBE, o que, a acontecer, aumentará a pressão sobre os fungicidas que permanecerem no mercado, nomeadamente a dodina. O facto dos fungicidas IBE, poderem já ter desenvolvido resistências na região e o facto de poder haver relações entre resistências a IBE e dodina (Köller & Wilcox, 2001), levanta questões de precaução e monitorização da utilização futura da dodina.

O conídios colocados em placas de Petri com ciprodinil apresentaram taxas de germinação que variaram entre 28,3%, nos conídios provenientes do pomar de baixo risco e 49,5% nos conídios provenientes de zona não frutícola, onde nunca foi aplicada esta família de fungicidas (Tabela 9). A relação de germinação dos conídios das diferentes proveniências, não permite tirar qualquer conclusão acerca da sensibilidade das diferentes populações de pedrado a esta substância activa. Apesar de se saber que este método não está preconizado para esta família de fungicidas, resolveu-se aplicar esta metodologia, com as mesmas condições das estrobilurinas, dado ser de resultado rápido, com conclusões em poucos dias. A intenção foi a obtenção dos primeiros resultados para a viabilização do método. Kunz *et al.* (1998) referem que os testes *in vitro* para a família das anilino pirimidinas conduzem a variações muito grandes, sendo os testes *in vivo*, utilizando plantas envasadas, mais adequados para a análise da sensibilidade de *V. inaequalis*. Do ponto de vista prático, estes

testes são mais morosos e trabalhosos. Schwabe (2006) demonstrou, com recurso a testes *in vivo*, que a aplicação continuada de ciprodinil entre 1996 e 2000, com seis aplicações no primeiro ano e três nos restantes anos, conduziu a perda de eficácia no pomar, devido ao desenvolvimento de resistência. Por este facto, esta família merece atenção, na implementação de estratégias anti-resistência.

A germinação de conídios, em meio de cultura contendo estrobilurinas, teve um comportamento semelhante para as duas substâncias activas (cresoxime-metilo e trifloxistrobina). Os resultados mostram existirem diferenças significativas consoante a proveniência dos conídios (Tabela 9).

No pomar de alto risco a germinação em meio com cresoxime-metilo e trifloxistrobina foi de 94,9% e 97,3%, respectivamente, tendo como referência a testemunha (100%). Apesar de se verificarem diferenças estatísticas (Tabela 10), a taxa de germinação é de tal forma elevada para duas estrobilurinas, que indica um elevado nível de resistência.

No pomar de baixo risco a germinação foi, em ambas as estrobilurinas, de 33,5%. A germinação não difere entre as duas estrobilurinas, mas difere significativamente para a testemunha (Tabela 10).

A germinação dos conídios provenientes da zona não frutícola, onde nunca foram aplicadas estrobilurinas foi de 0%, para o cresoxime-metilo e para a trifloxistrobina. A ausência de germinação dos conídios, provenientes da zona não frutícola, evidencia que esta população de *V. inaequalis* é totalmente sensível às estrobilurinas e que a metodologia está, presumivelmente, bem adaptada. A não ocorrência de germinação, provavelmente só ocorrerá onde as estrobilurinas nunca foram aplicadas, porque a população de *V. inaequalis* parece desenvolver gradualmente subpopulações resistentes. Broniarek-Nemiec & Bielenin (2008), utilizando uma metodologia completamente diferente para germinação de esporos de 53 pomares, apenas não obtiveram germinação em 3 pomares. Nos restantes pomares as germinações variaram entre 0,2% e 77,4%.

A existência de germinação a 2 ppm revela preocupação, inclusive no pomar de baixo risco. Sallato & Latorre (2006), que reportaram o primeiro caso de resistência de *V. inaequalis* a estrobilurinas no Chile, utilizando uma metodologia similar à do presente trabalho, consideraram como população resistente quando ocorreu germinação de 50% dos

conídios num meio contendo 0,1 ppm de cresoxime-metilo. Contudo, também verificaram a existência de germinação a 1 ppm.

Farber *et al.* (2002), realizaram ensaios *in vitro*, com ligeiras diferenças ao presente estudo, com amostras de vários países europeus, entre 1995 e 1999. De toda a amostra obtiveram duas amostras resistentes, que ao compará-las com uma população sensível, verificaram que as resistentes germinavam em meio de cultura com 3 ppm de trifloxistrobina, ao passo que a população sensível não germinava a partir de 0,01 ppm. Para as duas populações resistentes, a germinação a 3 ppm foi similar a 1 ppm, que foi de 71% a 1 ppm e 65% a 3 ppm para uma das populações resistentes e de 43% a 1 ppm e 45% a 3 ppm para a outra população resistente. Comparando estes dados, com o verificado no presente estudo, a população de *V. inaequalis* do pomar de alto risco apresenta valores muito superiores (94,6% e 97,3%) com 2 ppm de estrobilurinas. O pomar de baixo risco, apresenta taxas de germinação de 33,5%, que não são muito inferiores às verificadas numa das populações resistentes do estudo de Farber *et al.* (2002).

**Tabela 10** – Percentagem de conídios resistentes nas modalidades com estrobilurinas com referência à testemunha (100%), para as três origens dos conídios (resumo da Tabela anexo 11-25).

<b>Modalidade</b>	<b>Pomar alto risco</b>	<b>Pomar baixo risco</b>	<b>Zona não frutícola</b>
Testemunha	100 a	100 a	100 a
cresoxime-metilo	94,9 b	33,5 b	0 b
trifloxistrobina	97,3 ab	33,5 b	0 b

Nota: números seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (teste de Duncan).

Fontaine *et al.* (2009) referem a existência de uma forte associação entre a ocorrência da mutação G143A, com a detecção de resistência em ensaio de germinação *in vitro*. No pomar de alto risco a existência de níveis tão elevados de resistência, pode indiciar para a possível existência da mutação G143A, referida em diversos estudos, que leva a alto nível de resistência às estrobilurinas (Fontaine *et al.*, 2009).

### 4.3. Ensaio de campo vs. ensaio *in vitro*

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 continuada de estrobilurinas todos os anos, parecem ser as responsáveis pelo desenvolvimento de resistências a esta família de fungicidas. Uma taxa de germinação de 94,9% e 97,3%, em placas de Petri, tiveram uma correspondência de infecções de folhas, em campo, de 52,3% e 50,4% para cresoxime-metilo e trifloxistrobina, respectivamente. Por sua vez, os frutos desvalorizados com lesões de pedrado, foram de 47,8% e 55,3%, para cresoxime-metilo e trifloxistrobina, respectivamente. Estes valores de infecção no campo, apesar de serem inferiores às infecções ocorridas na modalidade testemunha, são inaceitáveis em fruticultura. Assim, as estrobilurinas não poderão voltar a ser aplicadas neste pomar. Se tivermos 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. A mutação G143A resulta da troca da glicina pela alanina na posição 143 da proteína do gene do citocromo b da mitocôndria de *Venturia inaequalis*, onde actuam as estrobilurinas, que confere alto nível de resistência.

Os conídios provenientes do pomar de baixo risco, tiveram uma taxa de germinação de cerca de um terço, em meio contendo estrobilurinas. Por sua vez, no ensaio de campo, as estrobilurinas foram eficazes no combate ao pedrado, não obstante da existência residual de folhas com 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 *V. inaequalis*, mesmo com declínio de sensibilidade às estrobilurinas, verificada em testes *in vitro*. Contudo, não sabemos 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. No entanto, apesar da não existência de diferenças significativas entre modalidades tratadas, a dodina não apresentou folhas ou frutos com pedrado, ao passo que as estrobilurinas tiveram presença de infecções, embora residuais. Na existência de vários anos com fortes condições meteorológicas para a ocorrência de pedrado, poderia manifestar-se perda de eficácia das estrobilurinas. Esta hipótese resulta da comparação da taxa de germinação de 33,5% para ambas as estrobilurinas a 2 ppm, no presente estudo, com os resultados obtidos por Farber *et al.* (2002) com taxas de germinação, em meio com estrobilurina, de 43% a 1 ppm e 45% a 3 ppm para uma população considerada resistente.

Kunz *et al.* (1998), associando ensaios *in vivo* e *in vitro*, em que estes últimos apresentam algumas diferenças em relação aos usados no presente trabalho, não verificaram a existência de dados que apontem para resistências, após 54 aplicações de cresoxime-metilo em 6 anos. Mas nesse estudo, a aplicação de estrobilurinas ainda estava, essencialmente, em fase experimental, pelo que ainda era cedo para que uma população de *V. inaequalis* desenvolvesse resistências. O maior problema no desenvolvimento de resistências ocorreu após a utilização generalizada das estrobilurinas. Fontaine *et al.* (2009) recolheram amostras de várias zonas frutícolas de França e realizaram ensaios *in vitro*, com uma metodologia diferente do presente trabalho e verificaram que, dos 73 pomares analisados, 46 apresentavam níveis considerados resistentes e verificaram que a tendência, é de aumento da resistência, facto que verificaram entre 2004 e 2007.

Pelo exposto, não existem dúvidas da forte resistência no pomar de alto risco, que se traduz na perda de eficácia no campo. Contudo, a taxa de germinação verificada no pomar de baixo risco, levanta a preocupação de que a partir de qualquer momento as estrobilurinas poderão deixar de conferir a protecção necessária.

## 5. Conclusões

A resistência do pedrado da macieira, causado pelo fungo *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.

Os resultados deste estudo demonstram que no pomar de alto risco, a falta de eficácia das estrobilurinas no combate ao pedrado é comprovada por taxas de resistência de 94,9% para cresoxime-metilo e de 97,3% para a trifloxistrobina, obtidas no ensaio *in vitro*. Por sua vez, no pomar de baixo risco, não se verificou perda de eficácia das estrobilurinas, no combate ao pedrado, contudo, no ensaio *in vitro*, a percentagem de germinação foi de 33,5%. O facto das condições para infecção serem muito reduzidas, neste pomar, pode ter mascarado alguma diminuição de eficácia das estrobilurinas. As taxas de germinação em ambos os pomares no ensaio *in vitro*, quando comparadas com 0% de taxa de resistência com conídios provenientes de zona não frutícola e nunca tratada com estrobilurinas, levantam preocupações na gestão do uso desta família de fungicidas.

O pomar de alto risco representa uma pequena fracção dos pomares da região. A generalidade dos pomares da região terá subpopulações de *V. inaequalis* resistentes às estrobilurinas, que podem não se manifestar facilmente em anos que decorram pouco chuvosos no ciclo anual da cultura, mas em anos de forte pressão, poderão expressar a sua severidade.

As estrobilurinas são excelentes ferramentas para o combate ao pedrado, que se pretende disponíveis e eficazes por muito tempo, pelo que é necessário utilizá-las de forma sustentável. A sua restrição a três aplicações por ano, para o combate ao pedrado, é insuficiente para manter esta família de fungicidas, com eficácia necessária a médio prazo.

Para uma eficaz gestão das resistências e para que tenha sucesso é essencial uma responsabilidade colectiva, dos detentores comerciais dos produtos fitofarmacêuticos, das autoridades reguladoras, dos técnicos consultores, dos vendedores e dos fruticultores. Não há novas famílias de fungicidas a entrar no mercado, pelo que é importante preservar as existentes.

Para além da aplicação de técnicas anti-resistência, é importante continuar a monitorizar os pomares de macieiras, para avaliar, em permanência, a sensibilidade das populações de *V. inaequalis* e orientar as estratégias de combate a esta doença.

Seria de interesse averiguar, no futuro, a existência da mutação G143A em pedrado, nos pomares da região. Esta mutação, que confere alto nível de resistência, poderá estar na origem da perda de sensibilidade às estrobilurinas.

A técnica *in vitro* utilizada mostrou-se eficaz e de rápido resultado para as estrobilurinas, mas não, quando testada com os fungicidas ciprodinil e dodina. No caso do ciprodinil não se obtiveram dados que permitam estabelecer uma relação, verificando-se que a metodologia não se adapta a esta substância activa. No caso da dodina deveria ser testada com uma concentração de 1 ppm no meio de cultura, em vez dos 2 ppm utilizados no presente estudo.



## Referências bibliográficas

- Agrios, G.N. (1997) - *Plant Pathology*. 4<sup>th</sup> ed.. Academic Press, Londres, 635 pp.
- Aylor, D.E. (1998) - The aerobiology of apple scab. *Plant Disease* 82: 838-847.
- Aylor, D.E. & Sanogo, S. (1997) - Germinability of *Venturia inaequalis* conidia exposed to sunlight. *Phytopathology* 87: 628-633.
- Bakker, G.R. (1999) - Sensitivity of *Venturia inaequalis* and *V. pirina* to dodine in New Zealand. *Proc. 52<sup>nd</sup> N. Z. Plant Protection Conf.*: 167-170.
- Braun P.G. & McRae, K.B. (1992) - Composition of a population of *Venturia inaequalis* resistant to myclobutanil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14: 215-220.
- Brent, K.J. & Hollomon (2007) - *Fungicide resistance: the assessment of risk*. FRAC Monograph n° 2. United Kingdom, 52 pp.
- Broniarek-Niemiec, A. & Bielenin, A. (2008) - Resistance of *Venturia inaequalis* to strobilurin and dodine fungicides in polish apple orchards; *Zemdirbyste-agriculture* 95: 366-372.
- Brown A.G. (1975) - Apples *In: Advances in Fruit Breeding*; J. Janik & J.n. Moore; (Eds.) Purdue University Press, West Lafayette, pp 3-37. *In: MacHardy* (1996).
- Carisse O.; Pillion, V.; Rolland, D. & Bernier, J. (2000) - Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 90: 31-37.
- Charest, J.; Dewdney, M.; Paulitz, T.; Pillion, V. & Carisse, O. (2002) - Spatial distribution of *Venturia inaequalis* airborne ascospores in orchards; *Phytopathology* 92: 769-779.
- Costa, C. (1998) - *Bases para o desenvolvimento da protecção integrada da macieira, na região da Beira Alta*; Dissertação de mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 239 pp.
- EPPO (2002) - *Efficacy evaluation of plant protection products. Resistance risk analysis*. PP1/213 (2).

- EPPO (2004) - *Guideline for the efficacy evaluation of fungicides. Venturia inaequalis and V. Pyrina*. PP1/5 (3).
- EPPO (2007) - Design and analysis of efficacy evaluation trials. *EPPO Bulletin* 37: 11-24.
- FAO (2009) – FAOSTAT. Agriculture data (on line). Disponível em <http://faostat.fao.org> (acesso em 15 de Novembro de 2009).
- Färber, R.B.K; Chin, K.M. & Leadbitter, N. (2002) - Sensitivity of *Venturia inaequalis* to tribloxistrobin. *Pest Management Science* 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 Management Science* 65: 74-81.
- FRAC (2009) [www.frac.info/frac/index.htm](http://www.frac.info/frac/index.htm) (acesso em Fevereiro de 2009).
- Gadoury, D.M.; MacHardy, W.E. & Chang-Cheng Hu (1984) - Effects of temperatura during ascus formation and frequency of ascospore discharge on pseudothecial development of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 68: 223-225.
- Gadoury, D.M.; Seem, R.C.; Rosenberger, D.A.; Wilcox, W.F.; MacHardy, W.E. & Berkett, L.P. (1992) - Disparity between morphological maturity of ascospores and physiological maturity of asci in *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 76: 277-282.
- Gadoury, D.M.; Stensvand, A. & Seem, R.C. (1998) - Influence of light, relative humidity, and maturity of population on discharge of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 88: 902-909.
- Gessler, C.; Patocchi, A.; Sansavini, S.; Tartarini, S. & Gianfranceschi, L. (2006) - *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Science* 25: 473-503.
- Giraud, M.; Baudry, O.; Orst, R. & Gendrier, J.P. (1996) - *Protection intégrée: Pommier-Poirier*. Ctifl, Paris, 277 pp.
- Hildebrand, P.D.; Lockhart, C.L.; Newbery, R.J. & Ross, R.G. (1988) - Resistance of *Venturia inaequalis* to bitertanol and other demethylation-inhibiting fungicides. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10; 311-316.

- Hollomon, D.W. & Brent, K.J. (2009) – Combating plant disease. The Darwin connection. *Pest Management Science* 62: 1156-1163 (abstract).
- Hsiang, T.; Ma, X.L. & Zhou, T. (2000) - Temporal and spatial analyses of genetic diversity in *Venturia inaequalis* assessed by RAPD markers. *Canadian Journal Plant Pathology* 22: 186.
- Jones, A.L. & Aldwinckle, H.S. (1990) - *Compendium of apple and pear diseases*. APS Press, Minnesota, 100 pp.
- Leppik, E.E. (1970) - Gene centers of plant as sources of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 8: 323-344 In MacHardy, W. E. (1996).
- Llácer, G.; López, M.M.; Trapero, A. & Bello, A. (1996) - *Patología Vegetal – Tomo II*. Sociedade Española de Fitopatología, 1165 pp.
- Kaplan, J.D. (1986) - Dispersal gradients and deposition efficiency of *Venturia inaequalis* ascospores and their relationship to lesion densities. Dissertação de Doutorado (Ph.D Thesis), University of New Hampshire, Durham. In: Charest, J. *et al.* (2002).
- Katan, T.; Shabi, E. & Gilpatrick, J.D. (1983) - Genetics of resistance to benomyl in *Venturia inaequalis* isolates from Israel and New York. *Phytopathology* 73: 600-603.
- Knauf-Beiter, G.; Dahmen, H.; Heye, U. & Staub, T. (1995) - Activity of cyprodinil: optimal treatment timing and site of action. *Plant Disease* 79: 1098-1103.
- Köller, W.; Parker, D.M. & Reynolds, K.L. (1991) - Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* to sterol demethylation inhibitors. *Plant Disease* 75: 726-728.
- Köller, W.; Parker, D.M.; Turechek, W.W. & Avila-Adame, C. (2004) - A two-phase resistance of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxistrobina. *Plant Disease* 88: 537-544.
- Köller, W.; Parker, D.M.; Turechek, W.W.; Rosenberger, D.; Wilcox, W.; Carrol, J., Agnello, A. & Reissing, H. (2005a) - Fungicide resistance of apple scab: status quo and management options. *New York Fruit Quarterly* 13: 9-17.
- Köller W. & Wilcox, W.F. (1999) - Evaluating of tactics for managing resistance of *Venturia inaequalis* to sterol demethylation inhibitors. *Plant Disease* 83: 857-863.

- Köller, W. & Wilcox, W.F. (2000) - Interactive effects of dodine and the DMI fungicide fenarimol in the control of Apple scab. *Plant Disease* 84: 863-870.
- Köller W. & Wilcox, W.F. (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, W.F.; Barnard, J.; Jones, A.L. & Braun, P.G. (1997) - Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* 87: 184-190.
- Köller W.; Wilcox, W.F. & Jones, A.L. (1999) - Quantification, persistence, and status of dodine resistance in New York and Michigan orchard population of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 83: 66-70.
- Köller W.; Wilcox, W.F. & Parker, D.M. (2005b) - Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to anilinopyrimidine fungicides and their contribution to scab management in New York. *Plant Disease* 89: 357-365.
- Küng, R.; Chin, K.M. & Gisi, U. (1999) - Sensitivity of *Venturia inaequalis* to cyprodinil. In: Lyr, H.; Russell, P.E.; Dehne, H.W. & Sisler, H.D. (Eds.), *Modern fungicides and antifungal compounds II*, Andover, UK: 313-322 (abstract).
- Kunz, S.; Deising, H. & Mendeng, K. (1997) - Acquisition of resistance to sterol demethylation inhibitors by population of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 87: 1272-1278.
- 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. Phytopathology* 146: 231-238.
- MacHardy, W.E. (1996) - *Apple Scab – Biology, Epidemiology and Management*. American Phytopathological Society, USA, 545 pp.
- MacHardy, W.E. & Gadoury, D.M. (1986) - Patterns of ascospore discharge by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 76: 985-990.
- MacHardy, W.E. & Gadoury, D.M. (1989) - A revision of Mills's criteria for predicting Apple scab infection periods. *Phytopathology* 79: 304-310.

- MacHardy, W.E.; Gadoury, D.M. & Gessler, C. (2001) - Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies. *Plant disease* 85: 1036-1051.
- Meszka, B.; Broniarek-Niemiec, A. & Bielenin, A. (2008) – The status of dodine resistance of *Venturia inaequalis* populations in Poland. *The Polish Phytopathological Society* 47: 57-61.
- Nothover, J. (1986) - Characterization and detection of benomyl resistant *Venturia inaequalis* in Ontario Apple orchards. *Canadian Journal of plant Pathology* 8: 117-231.
- Olaya, G. & Koller, W. (1999a) - Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Disease* 83: 274-278.
- Olaya, G. & Koller, W. (1999b) - Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pesticide Science* 55: 1083-1088 (abstract).
- Olaya, G.; Zheng, D. & Koller, W. (1998) - Differential response of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pesticide Science* 54: 230-236 (abstract).
- O’Leary, A.L. & Sutton, T.B. (1986) - The influence of temperature and moisture on the quantitative production of pseudothecia of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 76: 199-204.
- Ponti, I. & Laffi, F. (1998) - *Malattie crittogamiche delle piante da frutto*. Schede fitopatologiche. Edizioni L’Informatore Agrario. Verona. 206pp.
- Rocha, J.R.; Barros, V.C.; Vaz, M. & Vieira, T. (1991) - Estudo da competitividade do sector frutícola (maçã, avelã e castanha). Mercado nacional e mundial. *PDAR do Baixo Lafões e de Entre Dão e Mondego* 1: 37-85 In: Costa, C. (1998).
- Rosa, M.T. (1987) - *Modelo matemático de simulação a utilizar no combate dos pedrados da pereira e macieira Venturia pirina Aderh e Venturia inaequalis (Cooke) Aderh*. CNPPA, Oeiras, 15 pp.
- Rosa, M.T. (1993) -Previsão do desenvolvimento dos pedrados em pomóideas. Aplicação de sistemas de simulação. *Revista de Ciências Agrárias* 16: 107-114.
- Ross, R.G. & Newbery, R.J. (1977) - Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine in Nova Scotia. *Canadian Plant Disease Survey* 57: 57-60.

- Sallato, B.V. & Latorre, B.A. (2006) - First report of practical resistance to QoI fungicides in *Venturia inaequalis* (apple scab) in Chile. *Plant Disease* 90: 375 (abstract).
- Scheneato, P.G. (2007) - *Identificação da raça 1 de Venturia inaequalis no sul do Brasil e reação de acessos de macieira à sarna*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 108 pp.
- Schwabe, W. (2006) - A Chorus tolerant population of *Venturia inaequalis* found in South African apple orchard; *IOBC/wprs Bulletin* 29: 59-66.
- Sholberg, P.L.; Yorston, J.M. & Warnok, D. (1989) - Resistance of *Venturia inaequalis* to benomyl and dondine in British Columbia, Canada. *Plant Disease* 73: 667-669.
- Spotts, R.A.; Cervantes, L.A. & Niederholzer, F.J.A. (1997) - Effect of dolomitic lime on production of asci and pseudothecia of *Venturia inaequalis* and *V. pirina*. *Plant Disease* 81: 96-98.
- Stammler, G. & Klappach K. (2006) - *Spore germination test. QoI fungicides*. (on line). Disponível em <[www.frac.info/frac/index.htm](http://www.frac.info/frac/index.htm)>.
- Stanis, V.F., & Jones, A.L. (1985) - Reduced sensitivity to sterol-inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 75: 1098-1101.
- Steinfeil, U.; Sierotski, H.; Parisi, S.; Poirey, S. & Gisi, U. (2001) - Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pesticide Management Science* 57: 787-796. In: Fontaine, S. *et al.*, (2009) (abstract).
- Stensvan, A.; Amundsen, T.; Semb, L.; Gadoury, D.M. & Seem, R.C. (1998) - Discharge and dissemination of ascospores by *Venturia inaequalis* during dew. *Plant Disease* 82: 761-764.
- Sutton, D.K. (1992) - *A potential role for orchard sanitation in the management of apple scab (Venturia inaequalis (Cke) Wint.)*. Dissertação de mestrado (M. Sc. Thesis), University of New Hampshire, Durham. In: Carisse, O. *et al.* (2000).
- Sutton, D.K.; MacHardy, W.E. & Lord, W.G. (2000) - Effects of shredding or treating apple leaf litter with urea on ascospore dose of *Venturia inaequalis* and disease buildup. *Plant Disease* 84: 1319-1326.

- Szkolnik, M. & Gilpatrick, J.D. (1969) – *Apparent resistance of Venturia inaequalis to dodine in New York apple orchard*. Plant Disease Reporter 53: 861-865. In: MacHardy, W.E. (1996).
- Turechek, W.W. & Köller, W. (2004) - Managing resistance of Venturia inaequalis to the strobilurin fungicides (on line). *Plant Management Network*. Disponível em <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/strobilurin/>> (acesso em 12 Abril 2009).
- Vincelli, P. (2002) - QoI (strobilurin) fungicides: Benefits and Risks; *The Plant Health Instructor*; DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-02 (on line). Disponível em <<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/Strobilurin/top.htm>> (acesso em: 20 Outubro 2009).
- Warner, J. & Braun, P.G. (1992) - Discharge of *Venturia inaequalis* ascospores during daytime and nighttime wetting periods in Ontario and Nova Scotia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14: 315-321.
- Wilcox, W.F. (2001) - Apple scab. Tree fruit & berry pathology (on line). Disponível em <<http://www.nysaes.cornell.edu/pp/extensio/tfabp/apscpm.shtml>> (acesso em 12 Outubro 2009).
- Wong, F.P. & Wilcox, W.F. (2002) - Sensitivity to azoxystrobin among isolates of *Uncinula necator*: baseline distribution and relationship to miclobutanil sensitivity. *Plant Disease* 86: 394-404.
- Ypema, H.L. & Gold, R.E. (1999) - Kresoxim-methyl: modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* 83: 4-19.
- Zheng, D.; Olaya, G. & Köller, W. (2000) - Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl; *Curr Genet.* 38: 148-155. In: Fontaine, S. *et al.* (2009) (abstract).

## **Agradecimentos**

No final deste trabalho gostaria de testemunhar o meu agradecimento a diversas pessoas e instituições, sem a colaboração das quais tudo seria mais difícil, senão impossível.

Ao meu orientador Professor Doutor João Pedro Luz, por ter aceitado este desafio, pela entrega e disponibilidade em todas as fases do trabalho, pelos ensinamentos e pela cuidada revisão do trabalho final.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pelos meios disponibilizados para a realização do trabalho de laboratório.

À AAPIM, pela disponibilização de informação relevante para a execução do trabalho e pelo apoio transmitido.

Aos associados da AAPIM, que disponibilizaram os seus pomares para a realização dos ensaios de campo.

Ao Eng.º Paulo Parente pela partilha de conhecimentos e informação.

À Maria Helena Martins, técnica do laboratório de microbiologia da ESACB, pela ajuda disponibilizada para a execução do trabalho laboratorial.

À Célia, minha companheira de todos os dias e ao bebé que vem a caminho, pelo incentivo.



## Anexo 1 – Contagem de folhas com lesões de pedrado no ensaio de campo.

**Tabela Anexo 1-4 – Folhas com pedrado, na contagem de 50 folhas por árvore da parcela (200 folhas por parcela), em cada modalidade, em cada data de observação, no pomar de alto risco.**

Tabela anexo 1		Data: 7 Maio 2009					
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total	Total
Testemunha	Rep 1	2	0	2	0	2,0	2,6
	Rep 2	2	1	1	1	2,5	
	Rep 3	1	0	2	3	3,0	
	Rep 4	2	1	2	1	3,0	
cresoxime-metilo	Rep 1	0	0	1	1	1,0	3,3
	Rep 2	4	0	0	2	3,0	
	Rep 3	1	0	3	2	3,0	
	Rep 4	2	2	5	3	6,0	
trifloxistrobina	Rep 1	1	0	1	2	2,0	3,0
	Rep 2	1	2	1	1	2,5	
	Rep 3	2	1	2	2	3,5	
	Rep 4	1	2	4	1	4,0	
dodina	Rep 1	1	1	1	2	2,5	2,8
	Rep 2	3	2	2	1	4,0	
	Rep 3	0	0	3	0	1,5	
	Rep 4	3	1	2	0	3,0	

Tabela anexo 2		Data: 19 Maio 2009					
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total	Total
Testemunha	Rep 1	6	2	3	2	6,5	6,6
	Rep 2	3	2	3	5	6,5	
	Rep 3	4	2	1	4	5,5	
	Rep 4	3	4	4	5	8,0	
cresoxime-metilo	Rep 1	2	2	1	0	2,5	4,6
	Rep 2	1	4	0	2	3,5	
	Rep 3	2	2	3	2	4,5	
	Rep 4	5	4	3	4	8,0	
trifloxistrobina	Rep 1	1	0	2	2	2,5	4,9
	Rep 2	4	2	0	2	4,0	
	Rep 3	4	4	2	3	6,5	
	Rep 4	5	3	4	1	6,5	
dodina	Rep 1	3	0	1	1	2,5	2,4
	Rep 2	2	2	1	0	2,5	
	Rep 3	1	1	2	0	2,0	
	Rep 4	2	1	1	1	2,5	

Tabela anexo 3		Data: 26 Junho 2009					
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total	Total
Testemunha	Rep 1	17	15	15	11	29,0	26,9
	Rep 2	13	8	14	11	23,0	
	Rep 3	13	10	16	14	26,5	
	Rep 4	18	14	12	14	29,0	
cresoxime-metilo	Rep 1	4	7	8	7	13,0	17,9
	Rep 2	8	9	5	12	17,0	
	Rep 3	8	10	7	9	17,0	
	Rep 4	12	14	12	11	24,5	
trifloxistrobina	Rep 1	6	7	11	9	16,5	19,3
	Rep 2	8	8	10	7	16,5	
	Rep 3	14	10	11	9	22,0	
	Rep 4	12	11	11	10	22,0	
dodina	Rep 1	4	1	1	0	3,0	3,9
	Rep 2	2	3	1	3	4,5	
	Rep 3	2	1	4	2	4,5	
	Rep 4	3	2	1	1	3,5	

Tabela anexo 4		Data: à Colheita 2009					
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total	Total
Testemunha	Rep 1	37	39	41	37	77,0	72,6
	Rep 2	35	34	43	32	72,0	
	Rep 3	33	30	33	31	63,5	
	Rep 4	39	38	41	38	78,0	
cresoxime-metilo	Rep 1	22	18	20	16	38,0	52,3
	Rep 2	33	29	31	26	59,5	
	Rep 3	24	24	21	21	45,0	
	Rep 4	32	34	36	31	66,5	
trifloxistrobina	Rep 1	19	23	21	26	44,5	50,4
	Rep 2	21	26	23	29	49,5	
	Rep 3	24	20	18	18	40,0	
	Rep 4	34	35	34	32	67,5	
dodina	Rep 1	6	1	2	0	4,5	4,3
	Rep 2	3	2	3	2	5,0	
	Rep 3	2	3	3	1	4,5	
	Rep 4	3	1	1	1	3,0	

**Tabela Anexo 5-8** – Folhas com pedrado, na contagem de 50 folhas por árvore da parcela (200 folhas por parcela), em cada modalidade, em cada data de observação, no pomar de baixo risco.

Tabela anexo 5		Data: 7 Maio 2009					
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total	Total
Testemunha	Rep 1	0	0	0	0	0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0	
	Rep 3	0	0	0	0	0	
	Rep 4	0	0	0	0	0	
cresoxime-metilo	Rep 1	0	0	0	0	0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0	
	Rep 3	0	0	0	0	0	
	Rep 4	0	0	0	0	0	
trifloxistrobina	Rep 1	0	0	0	0	0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0	
	Rep 3	0	0	0	0	0	
	Rep 4	0	0	0	0	0	
dodina	Rep 1	0	0	0	0	0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0	
	Rep 3	0	0	0	0	0	
	Rep 4	0	0	0	0	0	

Tabela anexo 6		Data: 19 Maio 2009					
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total	Total
Testemunha	Rep 1	0	0	0	0	0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0	
	Rep 3	0	0	0	0	0	
	Rep 4	0	0	0	0	0	
cresoxime-metilo	Rep 1	0	0	0	0	0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0	
	Rep 3	0	0	0	0	0	
	Rep 4	0	0	0	0	0	
trifloxistrobina	Rep 1	0	0	0	0	0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0	
	Rep 3	0	0	0	0	0	
	Rep 4	0	0	0	0	0	
dodina	Rep 1	0	0	0	0	0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0	
	Rep 3	0	0	0	0	0	
	Rep 4	0	0	0	0	0	

Tabela anexo 7		Data: 26 Junho 2009					
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total	Total
Testemunha	Rep 1	0	0	0	1	0,5	2,5
	Rep 2	1	0	0	0	0,5	
	Rep 3	1	0	0	0	0,5	
	Rep 4	0	1	0	1	1,0	
cresoxime-metilo	Rep 1	0	1	0	0	0,5	0,5
	Rep 2	0	0	0	0	0,0	
	Rep 3	0	0	0	0	0,0	
	Rep 4	0	0	0	0	0,0	
trifloxistrobina	Rep 1	0	0	0	0	0,0	0,5
	Rep 2	0	0	0	0	0,0	
	Rep 3	0	0	0	0	0,0	
	Rep 4	1	0	0	0	0,5	
dodina	Rep 1	0	0	0	0	0,0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0,0	
	Rep 3	0	0	0	0	0,0	
	Rep 4	0	0	0	0	0,0	

Tabela anexo 8		Data: à Colheita 2009					
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total	Total
Testemunha	Rep 1	0	0	0	1	0,5	3,5
	Rep 2	0	1	0	0	0,5	
	Rep 3	1	0	0	1	1,0	
	Rep 4	0	2	0	1	1,5	
cresoxime-metilo	Rep 1	0	1	0	0	0,5	1
	Rep 2	0	0	0	0	0,0	
	Rep 3	0	0	0	0	0,0	
	Rep 4	0	1	0	0	0,5	
trifloxistrobina	Rep 1	0	0	0	0	0,0	0,5
	Rep 2	0	0	0	0	0,0	
	Rep 3	0	0	0	0	0,0	
	Rep 4	1	0	0	0	0,5	
dodina	Rep 1	0	0	0	0	0,0	0
	Rep 2	0	0	0	0	0,0	
	Rep 3	0	0	0	0	0,0	
	Rep 4	0	0	0	0	0,0	

## Anexo 2 – Contagem de frutos com lesões de pedrado no ensaio de campo

**Tabela Anexo 9** – Frutos com pedrado, na contagem de 25 frutos por árvore da parcela (100 folhas por parcela), em cada modalidade, no pomar de alto risco.

		Pomar de alto risco - Frutos com pedrado					Total	
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total		
Testemunha	Rep 1	18	22	21	17	78	62,8	
	Rep 2	12	14	19	15	60		
	Rep 3	15	18	17	17	67		
	Rep 4	12	11	11	12	46		
cresoxime- metilo	Rep 1	12	12	14	14	52	47,8	
	Rep 2	16	13	11	9	49		
	Rep 3	11	10	8	7	36		
	Rep 4	14	12	15	13	54		
trifloxistrobina	Rep 1	14	9	8	17	48	55,3	
	Rep 2	19	13	14	17	63		
	Rep 3	16	19	18	15	68		
	Rep 4	10	8	11	13	42		
dodina	Rep 1	1	1	1	1	4	2,3	
	Rep 2	0	1	0	0	1		
	Rep 3	1	0	1	1	3		
	Rep 4	0	0	0	1	1		

**Tabela Anexo 10** – Frutos com pedrado, na contagem de 25 frutos por árvore da parcela (100 folhas por parcela), em cada modalidade, no pomar de baixo risco.

		Pomar de baixo risco - Frutos com pedrado					Total	
		Árv. 1	Árv. 2	Árv. 3	Árv. 4	Total		
Testemunha	Rep 1	0	0	1	1	2	1,8	
	Rep 2	0	0	1	1	2		
	Rep 3	1	0	0	2	3		
	Rep 4	0	0	0	0	0		
cresoxime- metilo	Rep 1	0	0	0	0	0	0,5	
	Rep 2	1	0	0	0	1		
	Rep 3	0	0	0	0	0		
	Rep 4	0	1	0	0	1		
trifloxistrobina	Rep 1	0	0	0	0	0	0,0	
	Rep 2	0	0	0	0	0		
	Rep 3	0	0	0	0	0		
	Rep 4	0	0	0	0	0		
dodina	Rep 1	0	0	0	0	0	0,0	
	Rep 2	0	0	0	0	0		
	Rep 3	0	0	0	0	0		
	Rep 4	0	0	0	0	0		

### Anexo 3 – Contagem de esporos germinados no ensaio *in vitro*.

**Tabela Anexo 11-15** – germinação de conídios provenientes do pomar de alto risco em meio de cultura contendo os fungicidas testados e na testemunha.

Tabela anexo 11

		Esporos		Total	% conídios germin.	
		Germ.	Não germ.			
<b>Testemunha</b>	Placa 1	Rep. 1	86	14	100	86,0
		Rep. 2	87	13	100	87,0
		Rep. 3	91	12	103	88,3
		Rep. 4	59	3	62	95,2
		Rep. 5	90	17	107	84,1
		Rep. 6	85	16	101	84,2
	Placa 2	Rep. 7	92	20	112	82,1
		Rep. 8	82	16	98	83,7
		Rep. 9	94	20	114	82,5
		Rep. 10	85	20	105	81,0
		Rep. 11	83	18	101	82,2
		Rep. 12	87	14	101	86,1

Tabela anexo 12

		Esporos		Total	% conídios germin.	
		Germ.	Não germ.			
<b>trifloxistrobina</b>	Placa 1	Rep. 1	58	23	81	71,6
		Rep. 2	84	16	100	84,0
		Rep. 3	66	14	80	82,5
		Rep. 4	56	11	67	83,6
		Rep. 5	50	13	63	79,4
		Rep. 6	50	7	57	87,7
	Placa 2	Rep. 7	85	16	101	84,2
		Rep. 8	86	14	100	86,0
		Rep. 9	59	9	68	86,8
		Rep. 10	56	18	74	75,7
		Rep. 11	52	8	60	86,7
		Rep. 12	53	8	61	86,9

Tabela anexo 13

		Esporos		Total	% conídios germin.	
		Germ.	Não germ.			
<b>dodina</b>	Placa 1	Rep. 1	0	90	90	0,0
		Rep. 2	0	83	83	0,0
		Rep. 3	0	71	71	0,0
		Rep. 4	0	65	65	0,0
		Rep. 5	0	100	100	0,0
		Rep. 6	0	96	96	0,0
	Placa 2	Rep. 7	0	78	78	0,0
		Rep. 8	0	51	51	0,0
		Rep. 9	0	55	55	0,0
		Rep. 10	0	57	57	0,0
		Rep. 11	0	68	68	0,0
		Rep. 12	0	84	84	0,0

Tabela anexo 14

		Esporos		Total	% conídios germin.	
		Germ.	Não germ.			
<b>creosime-metilo</b>	Placa 1	Rep. 1	56	16	72	77,8
		Rep. 2	67	16	83	80,7
		Rep. 3	86	17	103	83,5
		Rep. 4	69	15	84	82,1
		Rep. 5	51	17	68	75,0
		Rep. 6	63	10	73	86,3
	Placa 2	Rep. 7	85	21	106	80,2
		Rep. 8	82	19	101	81,2
		Rep. 9	42	8	50	84,0
		Rep. 10	80	27	107	74,8
		Rep. 11	83	19	102	81,4
		Rep. 12	78	16	94	83,0

Tabela anexo 15

		Esporos		Total	% conídios Germin.	
		Germ.	Não germ.			
<b>ciprodinil</b>	Placa 1	Rep. 1	31	36	67	46,3
		Rep. 2	39	61	100	39,0
		Rep. 3	35	63	98	35,7
		Rep. 4	32	77	109	29,4
		Rep. 5	32	49	81	39,5
		Rep. 6	32	69	101	31,7
	Placa 2	Rep. 7	42	45	87	48,3
		Rep. 8	17	34	51	33,3
		Rep. 9	33	44	77	42,9
		Rep. 10	25	46	71	35,2
		Rep. 11	22	25	47	46,8
		Rep. 12	22	26	48	45,8

A partir destes dados:

A percentagem de esporos viáveis é determinada a 0 ppm por  $[(n.^{\circ} \text{ de conídios germinados} / \text{total de conídios contabilizados}) \times 100]$

A percentagem de conídios resistentes é determinada por  $[(\text{percentagem de conídios germinados a 2 ppm} / \text{percentagem de conídios germinados a 0 ppm}) \times 100]$

**Tabela Anexo 16-20** – germinação de conídios provenientes do pomar de baixo risco em meio de cultura contendo os fungicidas testados e na testemunha.

Tabela anexo 16

			Esporos		Total	% conídios Germin.
			Germ.	Não germ.		
<b>Testemunha</b>	Placa 1	Rep. 1	74	25	99	74,7
		Rep. 2	63	32	95	66,3
		Rep. 3	79	20	99	79,8
		Rep. 4	73	27	100	73,0
		Rep. 5	77	27	104	74,0
		Rep. 6	69	34	103	67,0
	Placa 2	Rep. 7	70	34	104	67,3
		Rep. 8	81	25	106	76,4
		Rep. 9	70	31	101	69,3
		Rep. 10	79	23	102	77,5
		Rep. 11	65	31	96	67,7
		Rep. 12	72	28	100	72,0

Tabela anexo 17

			Esporos		Total	% conídios Germin.
			Germ.	Germin.		
<b>trifloxistrobina</b>	Placa 1	Rep. 1	22	83	105	21,0
		Rep. 2	27	80	107	25,2
		Rep. 3	22	80	102	21,6
		Rep. 4	29	80	109	26,6
		Rep. 5	21	81	102	20,6
		Rep. 6	21	82	103	20,4
	Placa 2	Rep. 7	29	76	105	27,6
		Rep. 8	29	80	109	26,6
		Rep. 9	30	81	111	27,0
		Rep. 10	30	79	109	27,5
		Rep. 11	21	85	106	19,8
		Rep. 12	31	88	119	26,1

Tabela anexo 18

			Esporos		Total	% conídios Germin.
			Germ.	N. germ.		
<b>dodina</b>	Placa 1	Rep. 1	0	100	100	0,0
		Rep. 2	0	100	100	0,0
		Rep. 3	0	100	100	0,0
		Rep. 4	0	100	100	0,0
		Rep. 5	0	100	100	0,0
		Rep. 6	0	100	100	0,0
	Placa 2	Rep. 7	0	100	100	0,0
		Rep. 8	0	100	100	0,0
		Rep. 9	0	100	100	0,0
		Rep. 10	0	100	100	0,0
		Rep. 11	0	100	100	0,0
		Rep. 12	0	100	100	0,0

Tabela anexo 19

			Esporos		Total	% conídios Germin.
			Germ.	Germin.		
<b>creosoxime-metilo</b>	Placa 1	Rep. 1	29	77	106	27,4
		Rep. 2	22	87	109	20,2
		Rep. 3	20	81	101	19,8
		Rep. 4	18	82	100	18,0
		Rep. 5	27	73	100	27,0
		Rep. 6	22	78	100	22,0
	Placa 2	Rep. 7	41	83	124	33,1
		Rep. 8	30	80	110	27,3
		Rep. 9	23	78	101	22,8
		Rep. 10	28	93	121	23,1
		Rep. 11	32	83	115	27,8
		Rep. 12	21	79	100	21,0

Tabela anexo 20

			Esporos		Total	% conídios Germin.
			Germ.	N. germ.		
<b>ciprodimil</b>	Placa 1	Rep. 1	16	65	81	19,8
		Rep. 2	17	85	102	16,7
		Rep. 3	20	80	100	20,0
		Rep. 4	18	75	93	19,4
		Rep. 5	14	65	79	17,7
		Rep. 6	15	60	75	20,0
	Placa 2	Rep. 7	19	81	100	19,0
		Rep. 8	20	91	111	18,0
		Rep. 9	29	79	108	26,9
		Rep. 10	28	82	110	25,5
		Rep. 11	30	85	115	26,1
		Rep. 12	17	91	108	15,7

A partir destes dados:

A percentagem de esporos viáveis é determinada a 0 ppm por  $[(n.^{\circ} \text{ de conídios germinados} / \text{total de conídios contabilizados}) \times 100]$

A percentagem de conídios resistentes é determinada por  $[(\text{percentagem de conídios germinados a 2 ppm} / \text{percentagem de conídios germinados a 0 ppm}) \times 100]$

**Tabela Anexo 21-25** – germinação de conídios provenientes de zona não frutícola em meio de cultura contendo os fungicidas testados e na testemunha.

Tabela anexo 21

		Esporos		Total	% esporos	
		Germ.	N. germ.		Germin.	
<b>Testemunha</b>	Placa 1	Rep. 1	64	43	107	59,8
		Rep. 2	63	39	102	61,8
		Rep. 3	64	39	103	62,1
		Rep. 4	59	42	101	58,4
		Rep. 5	69	40	109	63,3
		Rep. 6	68	37	105	64,8
	Placa 2	Rep. 7	72	41	113	63,7
		Rep. 8	74	36	110	67,3
		Rep. 9	65	39	104	62,5
		Rep. 10	69	35	104	66,3
		Rep. 11	71	39	110	64,5
		Rep. 12	67	41	108	62,0

Tabela anexo 22

		Esporos		Total	% esporos	
		Germ.	N. germ.		Germin.	
<b>trifloxistrobina</b>	Placa 1	Rep. 1	0	100	100	0,0
		Rep. 2	0	100	100	0,0
		Rep. 3	0	100	100	0,0
		Rep. 4	0	100	100	0,0
		Rep. 5	0	100	100	0,0
		Rep. 6	0	100	100	0,0
	Placa 2	Rep. 7	0	100	100	0,0
		Rep. 8	0	100	100	0,0
		Rep. 9	0	100	100	0,0
		Rep. 10	0	100	100	0,0
		Rep. 11	0	100	100	0,0
		Rep. 12	0	100	100	0,0

Tabela anexo 23

		Esporos		Total	% esporos	
		Germ.	N. germ.		Germin.	
<b>dodina</b>	Placa 1	Rep. 1	0	100	100	0,0
		Rep. 2	0	100	100	0,0
		Rep. 3	0	100	100	0,0
		Rep. 4	0	100	100	0,0
		Rep. 5	0	100	100	0,0
		Rep. 6	0	100	100	0,0
	Placa 2	Rep. 7	0	100	100	0,0
		Rep. 8	0	100	100	0,0
		Rep. 9	0	100	100	0,0
		Rep. 10	0	100	100	0,0
		Rep. 11	0	100	100	0,0
		Rep. 12	0	100	100	0,0

Tabela anexo 24

		Esporos		Total	% esporos	
		Germ.	N. germ.		Germin.	
<b>creoxime-metilo</b>	Placa 1	Rep. 1	0	100	100	0,0
		Rep. 2	0	100	100	0,0
		Rep. 3	0	100	100	0,0
		Rep. 4	0	100	100	0,0
		Rep. 5	0	100	100	0,0
		Rep. 6	0	100	100	0,0
	Placa 2	Rep. 7	0	100	100	0,0
		Rep. 8	0	100	100	0,0
		Rep. 9	0	100	100	0,0
		Rep. 10	0	100	100	0,0
		Rep. 11	0	100	100	0,0
		Rep. 12	0	100	100	0,0

Tabela anexo 25

		Esporos		Total	% esporos	
		Germ.	N. germ.		Germin.	
<b>ciprodinil</b>	Placa 1	Rep. 1	24	78	102	23,5
		Rep. 2	31	79	110	28,2
		Rep. 3	42	61	103	40,8
		Rep. 4	33	69	102	32,4
		Rep. 5	36	61	97	37,1
		Rep. 6	34	71	105	32,4
	Placa 2	Rep. 7	34	81	115	29,6
		Rep. 8	20	81	101	19,8
		Rep. 9	30	73	103	29,1
		Rep. 10	33	68	101	32,7
		Rep. 11	36	75	111	32,4
		Rep. 12	39	67	106	36,8

A partir destes dados:

A percentagem de esporos viáveis é determinada a 0 ppm por  $[(n.^{\circ} \text{ de conídios germinados} / \text{total de conídios contabilizados}) \times 100]$

A percentagem de conídios resistentes é determinada por  $[(\text{percentagem de conídios germinados a 2 ppm} / \text{percentagem de conídios germinados a 0 ppm}) \times 100]$