

A MODELAGEM MATEMÁTICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE SUBPOPULAÇÕES DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS SOB O EFEITO DE DIFERENTES DOSAGENS E DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE APLICAÇÃO DE FUNGICIDAS.

Cláudia Galarda Varassin
Laércio L. Vendite
Departamento de Matemática Aplicada
IMECC - UNICAMP.

A ocorrência de doenças de plantas, especialmente as causadas por fungos patogênicos constitui, ainda atualmente, um dos grandes problemas encontrados por agricultores. Formas adequadas de controle têm sido fonte de investigação e estudo. Hoje em dia, a aplicação de fungicidas associada a outras estratégias de controle, como o uso de cultivares resistentes e a escolha de locais adequados para o plantio por exemplo, tem sido uma prática recomendada.

O controle químico, em grande escala, teve o seu início com a descoberta da calda Bordalesa no final do século XIX. Até a década de 60, todos os fungicidas empregados caracterizavam-se por serem inibidores de numerosos processos metabólicos vitais compartilhados por vários seres vivos. Recentemente, pesquisas levaram à descoberta de substâncias químicas capazes de agir seletivamente, atuando contra os patógenos visados, sem serem fitotóxicos às culturas tratadas [16]. Estes fungicidas, ao contrário dos anteriores, que não podiam penetrar nos tecidos das plantas pois seriam altamente fitotóxicos, podem se mover ao longo do sistema da planta. Foram denominados de sistêmicos. Apesar das inúmeras vantagens que o caráter específico confere a estes fungicidas, maior eficiência, maior persistência e efeito curativo, entre outras, há a grande desvantagem do aumento da chance de desenvolvimento de resistência. Uma simples mutação em um gene pode conferir o caráter resistente. Foi com o uso crescente e em grande escala destes novos fungicidas que surgiram os primeiros problemas de resistência de patógenos a fungicidas na agricultura [8].

Nem sempre o uso de um fungicida sistêmico implicará na perda de eficiência em condições de campo, mesmo tendo sido comprovado a obtenção de mutantes resistentes em laboratório [6]. A adaptabilidade da linhagem resistente comparada àquela da linhagem sensível é um dos fatores determinantes para o seu aumento na população. Para algumas combinações patógeno-fungicidas, a resistência parece estar ligada a uma redução de adaptabilidade [7]. Para outras, os mutantes parecem ser tão adaptados quantos os sensíveis. De acordo com Ghini [11], a adaptabilidade de linhagens resistentes, por exemplo a benzimidazóis, varia mas a maioria dos relatos indica que a resistência não está ligada a uma menor adaptabilidade e a resistência se mantém estável em vários patógenos, por longos períodos, mesmo na ausência de fungicidas.

Outros fatores, além da adaptabilidade dos mutantes, contribuem para o aumento ou não da população resistente, entre eles podemos citar: persistência do fungicida, intervalos entre

aplicações, área tratada, eficiência do produto químico, velocidade de crescimento dos patógenos e taxa de mutação. Com o objetivo de controlar o aumento de linhagens resistentes, se faz necessário descrever a dinâmica do processo, entender a influência de cada um destes fatores e tentar quantificá-los. A modelagem matemática tem se mostrado, neste sentido, uma ferramenta de grande utilidade e importância pois permite uma melhor compreensão do fenômeno.

1. O MODELO

Para descrever a dinâmica do crescimento de uma população de fungos constituída por 2 subpopulações, a sensível S e a resistente R , vamos assumir que as subpopulações são medidas através do tamanho da área vegetal infectada por uma ou outra linhagem. Consideramos também que cada subpopulação cresce segundo uma curva logística e que há uma inibição inter-linhagem devido à diminuição de recursos disponíveis (tecido sadio do hospedeiro). O modelo é dado por:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = r_S S(1 - N/k) - \alpha r_S S(1 - N/k) \\ \frac{dR}{dt} = r_R R(1 - N/k) + \alpha r_S S(1 - N/k) \end{cases} \quad (1.1)$$

onde $N = S + R$.

- k é a capacidade de suporte do meio dada pela área máxima de tecido vegetal sadio disponível.

- r_S e r_R são as taxas aparentes de infecção dos propágulos sensíveis e resistentes respectivamente no sentido de Van der Plank $\left[\frac{1}{\text{tempo}} \right]$.

- O termo $\alpha r_S S(1 - N/k)$ representa o fluxo de sensíveis para resistentes, onde α é a frequência da mudança dos biótipos sensíveis para resistentes, ocasionada por mutação ou por qualquer tipo de transferência de material genético.

A população resistente antes da aplicação de fungicidas.

O estudo do comportamento da proporção R/S sem a presença de fungicidas é importante para o entendimento da dinâmica das subpopulações sensível e resistente pois além de permitir que se verifique o efeito ocasionado pelo fluxo de biótipos de um fenótipo para outro, auxiliará no cálculo do tamanho da subpopulação resistente R_0 em uma dada população inicial \bar{N} , como veremos mais adiante.

A partir das equações 1.1, usando a regra da cadeia, obtém-se que

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{R}{S} \right) = \frac{1-N}{S} \left[R(r_R - r_S) + \alpha r_S N \right]$$

Dependendo dos valores relativos das taxas aparentes de infecção distinguimos três casos:

$$(1) \ r_S < r_R$$

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{R}{S} \right) = \frac{1-N}{S} \left[R(r_R - r_S) + \alpha r_S N \right] > 0 \quad \forall t$$

A proporção sempre aumenta e este aumento é tanto maior quanto maior for a diferença entre as taxas aparentes de infecção de sensíveis e resistentes e a taxa de mudança α .

$$(2) \ r_S = r_S$$

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{R}{S} \right) = \frac{1-N}{S} (\alpha r_S N) > 0$$

A proporção também aumenta. Quanto maior é a frequência de mutação mais rápido é este aumento. A variação da proporção, por unidade de tempo, com uma população total \bar{N} é mais lenta se comparada ao caso anterior já que $R(r_R - r_S) + \alpha R_S N > \alpha r_S N$ quando $r_S < r_R$.

$$(3) \ r_S > r_R$$

Neste caso a equação $\frac{d(R/S)}{dt} = 0$ admite, além da solução trivial, dois pontos de equilíbrio,

$$N = 1$$

e

$$\frac{R}{S} = \frac{\alpha r_S}{r_S(1-\alpha) - r_R} = V_c$$

Verifica-se que $\frac{d(R/S)}{dt} > 0 \Leftrightarrow R/S < V_c$.

Portanto, dependendo do valor da proporção R/S inicial, uma ou outra situação ocorrerá:

- Se a proporção R/S for alta ($R/S > V_c$) a proporção irá diminuir até atingir o estado de equilíbrio onde $N = 1$ ou até atingir o valor crítico V_c .
- Se a frequência de resistentes é baixa ($R/S < V_c$) o fluxo de biótipos sensíveis para resistentes ocasiona o aumento da proporção.

Para que se possa verificar o efeito de diferentes estratégias de controle na dinâmica populacional de linhagens sensíveis e resistentes é necessário conhecer a proporção de resistentes R em uma população dada de tamanho \bar{N} antes da aplicação de fungicidas.

Partindo do sistema 1.1, chamando de $x = \frac{R}{N}$ podemos escrever, após alguns algebrismos, que :

$$\frac{dN}{N} = \frac{(r_R - r_S)x + r_S}{-(x)^2(r_R - r_S) + x((r_R - r_S) - \alpha r_S) + \alpha r_S} dx \quad (1.2)$$

Admitindo que no início do processo $N(0) = 1, R(0) = 0$ podemos obter a relação entre N e R integrando a equação 1.2.

Quando $r_R = r_S(1 - \alpha)$ a equação 1.2 torna-se

$$\frac{dN}{N} = \frac{(r_R - r_S)x + r_S}{-(r_R - r_S)(x - 1)^2} dx \quad (1.3)$$

cuja solução é:

$$\frac{((1 - \alpha)/\alpha)R/N}{(1 - (R/N))} = \ln N + \ln((R/N) - 1) \quad (1.4)$$

Se $r_R \neq r_S(1 - \alpha)$ a integração é feita usando a decomposição em frações parciais. A solução é dada por

$$\frac{-r_R}{(r_R - r_S) + \alpha r_S} \ln\left(1 - \frac{R}{N}\right) + \frac{r_S(1 - \alpha)}{(r_R - r_S) + \alpha r_S} \ln\left|\frac{(r_R - r_S)R}{\alpha r_S N} + 1\right| = \ln N \quad (1.5)$$

Se $r_S = r_R$ a equação fica bastante simplificada

$$R = N(1 - N^{-\alpha}) \quad (1.6)$$

Quando $r_S \neq r_R$, o número de propágulos resistentes em uma dada população \bar{N} é obtido calculando os zeros da função

$$\frac{-r_R}{(r_R - r_S) + \alpha r_S} \ln\left(1 - \frac{R}{\bar{N}}\right) + \frac{r_S(1 - \alpha)}{(r_R - r_S) + \alpha r_S} \ln\left|\frac{(r_R - r_S)R}{\alpha r_S \bar{N}} + 1\right| - \ln \bar{N} = f(R) \quad (1.7)$$

Estudando o comportamento da função $f(R)$ podemos verificar que

$$R_{\text{des}} = \frac{-\alpha r_S}{r_R - r_S} \bar{N}$$

é o único ponto de descontinuidade.

A região de interesse da função $f(R)$ é $R \in [0, \bar{N}]$. É necessário, dados os parâmetros, esboçar o gráfico da função, de forma que se possa identificar as regiões onde se encontram as raízes de $f(R)$ e utilizar um método numérico para obtê-la(s). Dependendo dos valores relativos r_S , r_R e α , a função $f(R)$ apresenta os seguintes comportamentos:

- Quando $r_S < r_R$ temos que

$$R_{\text{des}} < 0$$

$$\lim_{R \rightarrow R_{\text{des}}^+} f(R) = -\infty, \quad \lim_{R \rightarrow \bar{N}^-} f(R) = +\infty$$

e

$$f(0) = -\ln \bar{N}$$

Portanto temos uma única raiz positiva.

- Quando $r_S > r_R$

$$R_{\text{des}} > 0$$

Se $(r_R - r_S + \alpha r_S) > 0$ ou seja, a diferença relativa entre as adaptabilidades for menor que a taxa do fluxo de mutantes $(\frac{r_S - r_R}{r_S} < \alpha)$ temos que

$$\frac{-\alpha r_S}{r_R - r_S} > 1 \implies R_{\text{des}} > \bar{N}$$

Neste caso, o ponto de descontinuidade está fora do domínio da função e

$$\lim_{R \rightarrow \bar{N}} f(R) = +\infty, \quad \text{e} \quad \lim_{R \rightarrow 0} f(R) = -\ln \bar{N}$$

Podemos verificar que este caso é muito próximo ao discutido anteriormente ($r_R = r_S$) pois apesar de $r_S \neq r_R$, a diferença $r_S - r_R$ é quase nula $(\frac{r_S - r_R}{r_S} < \alpha \approx r_S - r_R = 0)$

Quando há uma diferença significativa de adaptabilidade entre sensíveis e resistentes $(\frac{r_S - r_R}{r_S} > \alpha)$ temos que

$$0 < R_{des} < \bar{N}$$

$$\lim_{R \rightarrow R_{des}^+} f(R) = +\infty, \quad \lim_{R \rightarrow R_{des}^-} f(R) = +\infty$$

$$\text{e} \quad \lim_{R \rightarrow \bar{N}^+} f(R) = -\infty$$

Estamos interessados em saber o número de propágulos resistentes em uma população com \bar{N} propágulos, assumindo que no início só havia um propágulo sensível e nenhum resistente ($R/N = 0$). Assim, de acordo com o que já foi visto, a proporção R/S tem, neste caso, um comportamento crescente ($r_S > r_R$ e $R_0/S_0 < V_c$). A medida que a população total aumenta, R aumenta e a proporção R/S cresce continuamente mas não ultrapassa o valor crítico V_c . Como $R/N < R/S$, a proporção R/N não ultrapassará o valor $\frac{-\alpha r_S}{r_R - r_S}$ (valor da proporção R/N correspondente à proporção R/S crítica V_c). Assim, apesar de existirem duas raízes positivas,

$$R_1 < \frac{-\alpha r_S}{r_R - r_S} \bar{N} \quad \text{e} \quad R_2 > \frac{-\alpha r_S}{r_R - r_S} \bar{N}$$

apenas uma, a menor raiz (R_1), representa um ponto solução do sistema 1.1 com as condições iniciais $S(0) = 1$ e $R(0) = 0$.

Com exceção do caso $r_S = r_R$, feito o estudo gráfico da região contendo os zeros de 1.7 e 1.4, o cálculo das raízes é obtido numericamente, utilizando a rotina do método de Newton-Raphson implementada no *Mathematica*.

Afim de que possamos simular o crescimento das subpopulações tomando os parâmetros de taxa aparente de infecção para retratar a taxa com a qual as subpopulações irão se desenvolver em condições específicas, vamos usar o modelo sob o ponto de vista epidemiológico. Assim as variáveis S e R se referirão às lesões causadas por biótipos sensíveis e resistentes.

Para cada combinação patógeno/hospedeiro/ambiente, a relação entre o número de propágulos com o tamanho da área de tecido vegetal lesionado ou com a proporção da área lesionada em uma folha, planta ou plantação, deve ser estimada para que se possa calcular a proporção inicial de resistentes em uma infecção a ser tratada.

Supondo por exemplo que 10^6 propágulos correspondem a uma proporção infectada de 1%, poderemos saber naquele instante qual a proporção de área lesionada devido à infecção por propágulos sensíveis e resistentes e a partir daí prever o comportamento das subpopulações sob diferentes programas de controle.

2. A DINÂMICA DAS SUBPOPULAÇÕES NA PRESENÇA DE FUNGICIDAS

Para que se possa descrever a dinâmica populacional de fungos sensíveis e resistentes em uma área tratada com fungicida, é necessário, em primeiro lugar, conhecer a relação entre a concentração do fungicida presente e a magnitude do efeito causado por esta concentração.

A maneira com a qual os fungos fitopatogênicos reagem a diferentes concentrações de fungicidas é um fato amplamente estudado. Há um interesse em várias áreas da biologia e medicina.

A resposta dos microorganismos aos produtos químicos tem um comportamento típico: o efeito de inibição aumenta com o aumento da dose até um patamar máximo que corresponde a um nível de saturação e há uma região onde um pequeno acréscimo na dose ocasiona grande aumento de inibição.

Em se tratando de fungos fitopatogênicos, estudos realizados para se determinar o grau de inibição causado por uma dose x são feitos através de sucessivos experimentos. Placas com meio de cultura ou folhas de plantas sadias, contendo crescentes doses de fungicidas são inoculadas com o fungo. O desenvolvimento do fungo é comparado com o crescimento observado na placa ou folha, livres do fungicida (placas controle). Com os pontos, porcentagem de inibição versus concentração, é possível ajustar a curva dose resposta para aquela combinação fungo/fungicida [9].

Curvas logísticas, assim como algumas outras curvas, têm sido usadas como curvas dose-resposta ([1, 10]) já que apresentam um comportamento sigmóide.

O decaimento da quantidade ativa de fungicida entre duas pulverizações é modelado por muitos autores, como uma exponencial negativa com taxa constante [14, 19]. Vários estudos mostram que a queda exponencial é uma boa aproximação para a dinâmica de muitos pesticidas usados [3, 18]. A medida da velocidade de decaimento é dada em geral pelo parâmetro "tempo de meia vida (T_{mv})" que corresponde ao tempo gasto para que a concentração seja a metade da concentração inicial (C_0) aplicada.

A função da concentração da dose é

$$C(t) = C_0 e^{-\left(\frac{\ln 2}{T_{mv}} t\right)}$$

O modelo com um fungicida

Na presença do fungicida o crescimento dos propágulos sensíveis é diminuído. A redução é dado por um fator que depende da eficácia do produto aplicado e a eficácia, por sua vez, é

função da concentração do fungicida presente em um dado instante t .

O fator de redução $f(t)$ é dado por

$$f(t) = (1 - \text{eficácia}(t))$$

$$\text{eficácia}(t) = \frac{1}{1 + \beta e^{-\lambda \log C(t)}}$$

onde β e λ são os parâmetros característicos da curva dose-resposta para a combinação fungo-fungicida em questão e a função da concentração $C(t)$ tem queda exponencial.

Vamos assumir que a subpopulação mutante é completamente resistente ao fungicida.

Cada nova pulverização representa uma perturbação no sistema. O comportamento das subpopulações no meio com fungicida fica sendo,

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = r_S f(t) S(1 - S - R) - \alpha r_S f(t) S(1 - S - R) \\ \frac{dR}{dt} = r_R R(1 - R - S) + \alpha r_S f(t) S(1 - S - R) \end{cases} \quad (2.1)$$

$$kT < t \leq (k+1)T \quad k = 0, 1, 2, \dots, n \quad n = \text{número de aplicações}$$

T = intervalo entre as aplicações.

e

$$f(t) = \left(1 - \frac{1}{1 + \beta e^{-\lambda \log(\text{conc}(t-KT))}} \right)$$

O modelo com o uso alternado de dois fungicidas

O uso de um fungicida convencional usado em alternadas aplicações com o fungicida sistêmico é uma prática aconselhada para diminuir a pressão de seleção. Ao assumirmos que as linhagens sensível e resistente respondem de forma similar ao fungicida protetor e ainda que o intervalo entre duas pulverizações é constante, temos o seguinte sistema diferencial,

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = r_S f_{S_i}(t) S(1 - S - R) - \alpha r_S f_{S_i}(t) S(1 - S - R) \\ \frac{dR}{dt} = r_R f_{R_i}(t) R(1 - R - S) + \alpha r_S f_{S_i}(t) S(1 - S - R) \end{cases} \quad (2.2)$$

para $kT < t < (k+1)T$, $k = 0, 1, 2, \dots, n$.

Quando K é par ($i = 1$)

$$f_{S_1}(t) = \left(1 - \frac{1}{1 + \beta_1 e^{-\lambda_1 \log(\text{conc}(t-KT))}} \right)$$

$$f_{R_1}(t) = 1$$

β_1 e λ_1 são os parâmetros da curva dose-resposta do fungo sensível com o fungicida sistêmico.

Quando K é ímpar ($i = 2$)

$$f_{S_2}(t) = f_{R_2}(t) = \left(1 - \frac{1}{1 + \beta_2 e^{-\lambda_2 \log(\text{conc}(t-KT))}} \right)$$

β_2 e λ_2 são os parâmetros da curva eficácia do fungicida convencional sobre sensíveis e resistentes.

O modelo com a mistura de dois fungicidas

Existem no mercado misturas já prontas contendo uma combinação de um fungicida sistêmico com outro de ação inespecífica visando diminuir a pressão de seleção [17]. Apesar do uso ser muito indicado não se pode generalizar esta estratégia como a solução ideal. Cada combinação tem características próprias e a resistência deve ainda ser controlada.

O estudo da dinâmica das subpopulações sensível e resistente com o uso de misturas é complexo. Uma das maiores dificuldades está talvez em se predizer a eficácia de uma mistura. Alguns trabalhos, como o livro de Finney [10] e o artigo de Cohen e Levy [5] tratam do assunto.

Genericamente se diz que a ação biológica de uma mistura pode ser igual (aditiva), menor (antagonista) ou maior (sinérgica) que o efeito combinado dos compostos agindo em separado [5]. Quando os produtos agem segundo princípios ativos diferentes e independentes uns dos outros, o efeito final é equivalente à resposta devido a um fungicida acrescido do efeito causado pelo outro produto (ação aditiva). Se o efeito de A é o de reduzir o crescimento por um fator f_A

e o efeito de B é o de reduzir por um fator f_B então o efeito final é a combinação dos 2 efeitos:

$$f_{mis\ AB} = f_A * f_B$$

Apesar da ocorrência de ação sinérgica não ser rara trataremos neste trabalho apenas do caso de ação independente. O sistema de equações diferenciais que descreve as subpopulações na presença de mistura é portanto o seguinte :

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = r_S f_{S_{mis}}(t) S(1 - S - R) - \alpha r_S f_{S_{mis}}(t) S(1 - S - R) \\ \frac{dR}{dt} = r_R f_{R_{mis}}(t) R(1 - R - S) + \alpha r_S f_{S_{mis}}(t) S(1 - S - R) \end{cases} \quad (2.3)$$

para $kT < t < (k + 1)T$

onde

$$f_{S_{mis}} = (1 - \text{eficáciaA}(t))(1 - \text{eficáciaB}(t))$$

$$f_{R_{mis}} = (1 - \text{eficáciaB}(t))$$

Vamos considerar, novamente, que a resistência é total.

Simulações

Afim de verificar o comportamento de diferentes estratégias de aplicação sob diferentes dosagens, um programa foi implementado no software *Mathematica*. O programa é estruturado de forma que a cada nova aplicação de fungicida a solução de 2.1, 2.2 e de 2.3 é calculada para condições iniciais dadas pelo tamanho das subpopulações de sensíveis e resistente (S e R) no final do intervalo anterior. O tamanho inicial das subpopulações S_0 e R_0 em uma dada população \bar{N} , antes da 1ª pulverização, é fornecida pela solução da equação 1.7, obtida numericamente ou diretamente dado pelas relações 1.6 e 1.4.

É através da rotina *NDSolve* existente no software *Mathematica* que as soluções das equações diferenciais 2.1, 2.2 e de 2.3 são obtidas. O *NDSolve* calcula as soluções numericamente empregando o método de Adams predictor corretor.

Tomamos, como exemplo ilustrativo, o problema da resistência de *Botrytis squamosa* a fungicidas do grupo dos benzimidazóis. Baseando-se em dados obtidos em laboratório por Ghini ([11]), simulamos a dinâmica das linhagens sensíveis e resistentes de *Botrytis squamosa* infestando culturas que se desenvolvem em estufas e tratadas pelos fungicidas sistêmico benomyl e convencional captafol. Convém ressaltar que o estudo é apenas uma aproximação pois, como não dispomos de dados coletados em estufas, usamos os dados de laboratório. Alguns parâmetros são hipotéticos ou tomados por analogia de casos descritos na literatura.

Com o objetivo de simular situações de infestação rápida e infestação mais lenta, foram tomados valores de taxa aparente de infecção iguais a 0.2; 0.18 (10% menor que o valor 0.2) e 0.1; 0.09 (10% menor que o valor 0.1). Estas taxas, corresponderiam, na fase exponencial do crescimento, a uma duplicação em 3.5; 3.7; 7 e 7.7 dias respectivamente. Ajustando uma curva logística sobre os dados de crescimento micelial em meio de cultura (normalizados), fornecidos por Ghini, obtém-se uma taxa $r = 0.84$. Esta taxa, bem mais elevada do que a adotada, corresponde apenas ao crescimento micelial no meio onde as condições são ideais. Os valores adotados são de infestações sobre uma cultura fictícia. Nos casos simulados usamos $r_S = r_R$ ou $r_S > r_R$ pois aparentemente o caso de mutantes resistentes mais adaptados que os sensíveis é mais raro [4, 11]. Foram tomados uma alta ($\alpha = 10^{-5}$) e baixa ($\alpha = 10^{-8}$) frequência de transferência de indivíduos sensíveis para resistentes.

As curvas de eficácia são provenientes do estudo de inibição sobre sensíveis e resistentes feitas por Ghini. Segundo a autora, a concentração de 1 ppm (1 parte por milhão) inibe consideravelmente o crescimento da linhagem sensível de *Botrytis squamosa* em meio de cultura. Hipotetizando que este seja o seu EC_{90} e que o $EC_{99} = 10ppm$ podemos obter, via transformação $z = \frac{\text{eficácia}}{1 - \text{eficácia}}$ os valores de β e λ da curva dose-resposta logística. A curva (benomyl sobre a linhagem sensível) neste caso é:

$$\text{eficácia}(t) = \frac{1}{1 + 0.1111e^{-2.3979 \log C(t)}} \quad (2.4)$$

O $EC_{50} = 0.12ppm$ e o $EC_{90} = 1.0ppm$.

O efeito do fungicida convencional (captafol) sobre os propágulos sensíveis e resistentes tem parâmetros $\beta = 3.2184$ e $\lambda = 1.96$, que corresponde a um $EC_{50} = 4.0ppm$ e o $EC_{90} = 52.0ppm$.

Para o tempo de meia vida do fungicida sistêmico e do fungicida convencional foram adotados os valores de 6 e 3 dias respectivamente. Realizamos inúmeras simulações, variando a dosagem de fungicida sistêmico e a estratégia de controle para uma grande combinação de fatores r_S , r_R e α . Simulamos também o uso de alternância do produto seletivo com o convencional (doses variadas para o sistêmico e dose de 50 ppm para o protetor) e o uso de mistura dos 2 produtos (com doses iguais à metade daquelas empregadas na alternância).

Primeiramente, simulou-se o crescimento das linhagens sensível e resistente sob o efeito unicamente do fungicida sistêmico, aplicado repetidas vezes, com um intervalo de 15 dias entre as aplicações.

Numa segunda etapa, verificou-se o efeito de se alternar com o fungicida sistêmico um convencional e o efeito do uso da mistura dos dois produtos.

Na aplicação de misturas adotou-se doses iguais à metade daquelas adotadas na alternância, de forma que, ao final de 2 períodos de pulverização, a concentração aplicada total de fungicida convencional e de fungicida sistêmico fossem as mesmas para ambas estratégias.

Nestas simulações, partiu-se de uma proporção de área de tecido vegetal lesionado de 0.01 para todos os 4 ciclos. A proporção de resistentes, em relação à população total na área inicial lesionada, foi calculada pelas relações 1.6 ou 1.7 para o 1º ciclo.

Adotou-se como proporção R/N no início da infestação do 2º, 3º e 4º ciclo, a mesma proporção R/N observada no final do ciclo imediatamente anterior, isto porque, considerou-se que o inóculo inicial de fungos fitopatogênicos em estufas depende do histórico da epidemia, no cultivo passado.

Os resultados, colocados nas tabelas 1 a 6, mostram a proporção $p = R/N$ no final de cada ciclo de 60 dias e o número de aplicações necessárias para que a população torne-se totalmente resistente (n_{tot}).

Nas tabelas 3 e 4, mostra-se o efeito do uso alternado do fungicida sistêmico (benomyl a 1 ppm e a 10 ppm) com o fungicida convencional (captafol a 50 ppm). As tabelas 5 e 6 mostram os resultados observados quando se usa uma mistura de fungicida sistêmico (benomyl a 0.5 ppm e a 5 ppm) com um produto convencional (captafol a 25 ppm).

TABELA 1(a,b). Proporção (p) final de resistentes na população total em 4 ciclos consecutivos de cultura com o uso de um fungicida sistêmico sob o efeito de diferentes dosagens. Infecção rápida ($r_S = r_R = 0.2$ ou $r_S = 0.2$ e $r_R = 0.18$).

(a) $\alpha = 10^{-5}$

Dose	r_S, r_R	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	n_{tot}
1 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.42$	$p = 0.98$	sem controle	sem controle	8
	$r_S > r_R$	$p = 0.18$	$p = 0.98$	sem controle	sem controle	9
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.92$	$p = 0.99$	sem controle	sem controle	5
	$r_S > r_R$	$p = 0.69$	$p = 0.99$	sem controle	sem controle	6
300 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.95$	$p = 0.99$	sem controle	sem controle	5
	$r_S > r_R$	$p = 0.79$	$p = 0.99$	sem controle	sem controle	6

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-4}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-4}$

(b) $\alpha = 10^{-8}$

Dose	r_S, r_R	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	n_{tot}
1 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.0$	$p = 0.75$	$p = 0.99$	sem controle	10
	$r_S > r_R$	$p = 0.0$	$p = 0.20$	$p = 0.96$	sem controle	11
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.01$	$p = 0.98$	sem controle	sem controle	8
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.97$	$p = 0.99$	sem controle	9
300 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.03$	$p = 0.99$	sem controle	sem controle	7
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.98$	$p = 0.99$	sem controle	8

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-7}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-7}$

TABELA 2(a,b). Proporção (p) final de resistentes na população total em 4 ciclos

consecutivos de cultura com o uso de um fungicida sistêmico sob o efeito de diferentes dosagens. Infecção lenta ($r_S = r_R = 0.1$ ou $r_S = 0.1$ e $r_R = 0.09$).

(a) $\alpha = 10^{-5}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
1 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.01$	$p = 0.50$	$p = 0.97$	$p = 0.99$	12
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.15$	$p = 0.88$	$p = 0.99$	14
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.04$	$p = 0.92$	$p = 0.99$	$p = 0.99$	9
	$r_S > r_R$	$p = 0.01$	$p = 0.70$	$p = 0.99$	$p = 0.99$	12
300 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.05$	$p = 0.95$	$p = 0.99$	$p = 0.99$	9
	$r_S > r_R$	$p = 0.02$	$p = 0.78$	$p = 0.99$	$p = 0.99$	12

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-4}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-4}$

(b) $\alpha = 10^{-8}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
1 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.08$	$p = 0.86$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.28$	> 16
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 0.01$	$p = 0.81$	$p = 0.99$	13
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.29$	$p = 0.98$	15
300 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 0.02$	$p = 0.90$	$p = 0.99$	13
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.48$	$p = 0.99$	15

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-7}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-7}$

TABELA 3(a,b). Proporção (p) final de resistentes na população total em 4 ciclos consecutivos de cultura com o uso de um fungicida sistêmico usado em alternância com um fungicida convencional (dose de 50 ppm) sob o efeito de diferentes dosagens do fungicida seletivo. Infecção rápida. ($r_S = r_R = 0.2$ ou $r_S = 0.2$ e $r_R = 0.18$).

(a) $\alpha = 10^{-5}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
1 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.01$	$p = 0.50$	$p = 0.97$	$p = 1.0$	11
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.15$	$p = 0.87$	$p = 0.99$	13
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.04$	$p = 0.92$	$p = 0.99$	sem controle	9
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.69$	$p = 0.99$	$p = 0.99$	11

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-4}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-4}$

(b) $\alpha = 10^{-8}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
1 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.08$	$p = 0.86$	16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.28$	> 16
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 0.01$	$p = 0.81$	$p = 1.0$	13
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	$p = 0.29$	$p = 1.0$	15

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-7}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-7}$

TABELA 4(a,b). Proporção (p) final de resistentes na população total em 4 ciclos consecutivos de cultura com o uso de um fungicida sistêmico usado em alternância com um fungicida convencional (dose de 50 ppm) sob o efeito de diferentes dosagens do fungicida seletivo. Infecção lenta ($r_S = r_R = 0.1$ ou $r_S = 0.1$ e $r_R = 0.09$).

(a) $\alpha = 10^{-5}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
1 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.01$	$p = 0.10$	$p = 0.48$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.02$	$p = 0.10$	> 16
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.04$	$p = 0.42$	$p = 0.91$	16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-4}$	$p = 0.01$	$p = 0.11$	$p = 0.59$	> 16

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-4}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-4}$

(b) $\alpha = 10^{-8}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
1 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-7}$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	> 16
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	$p = 0.01$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-7}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	> 16

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-7}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-7}$

TABELA 5(a,b). Proporção (p) final de resistentes na população total em 4 ciclos consecutivos de cultura com o uso de um fungicida sistêmico usado em mistura com um fungicida convencional (dose de 25 ppm) sob o efeito de diferentes dosagens do fungicida seletivo. Infecção rápida. ($r_S = r_R = 0.2$ ou $r_S = 0.2$ e $r_R = 0.18$).

(a) $\alpha = 10^{-5}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
0.5 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.07$	$p = 0.60$	$p = 0.95$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.01$	$p = 0.15$	$p = 0.68$	> 16
5 ppm	$r_S = r_R$	$p = 0.03$	$p = 0.83$	$p = 1.0$	sem controle	9
	$r_S > r_R$	$p = 0.01$	$p = 0.48$	$p = 0.98$	$p = 0.99$	12

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-4}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-4}$

(b) $\alpha = 10^{-8}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
0.5 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.03$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	> 16
5 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.52$	$p = 0.99$	15
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.10$	$p = 0.91$	16

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-7}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-7}$

TABELA 6(a,b). Proporção (p) final de resistentes na população total em 4 ciclos consecutivos de cultura com o uso de um fungicida sistêmico usado em mistura com um fungicida convencional (dose de 25 ppm) sob o efeito de diferentes dosagens do fungicida seletivo. Infecção rápida. ($r_S = r_R = 0.1$ ou $r_S = 0.1$ e $r_R = 0.09$).

(a) $\alpha = 10^{-5}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
0.5 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.02$	$p = 0.07$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	$p = 10^{-3}$	$p = 0.01$	> 16
5 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-4}$	$p = 0.03$	$p = 0.28$	$p = 0.84$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-4}$	$p = 0.01$	$p = 0.08$	$p = 0.49$	> 16

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-4}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-4}$

(b) $\alpha = 10^{-8}$

Dose	r_S, r_R	1 ^o ano	2 ^o ano	3 ^o ano	4 ^o ano	n_{tot}
0.5 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-7}$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-7}$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	> 16
10 ppm	$r_S = r_R$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-3}$	> 16
	$r_S > r_R$	$p = 10^{-7}$	$p = 10^{-6}$	$p = 10^{-5}$	$p = 10^{-4}$	> 16

Quando $r_S = r_R$ a proporção inicial é de $1.38 \cdot 10^{-7}$, quando $r_S > r_R$ a proporção inicial é de $0.748 \cdot 10^{-7}$

Bibliography

- [1] Barracho, I.R. e Piedrabuena, A.E. 1977. *Determinação de doses letais em microorganismos*. Ciência e Cultura 29(3):314-316.
- [2] Bedendo, J.P. e Krugner, T.L. 1987 *Persistência de benomyl em mudas de Eucalyptus cloeziana aplicado em pulverização foliar*. Summa Phytopathologica. Resumos do 10^o Congresso paulista de Fitopatologia, Piracicaba, 1987. Grupo paulista de Fitopatologia, Vol.13, p.36
- [3] Bruhn, J.A. and Fry, W.E. 1982 *A mathematical model of spacial and temporal dynamics of chlorothanil residues on potato foliage*. Phytopathology 72:1306-1312.
- [4] Cabrini, H.M. 1985. *Ocorrência de isolados de Botrytis cinerea Pers. ex. Fr. resistente a benomyl em morangos (Fragaria spp.) no Estado de São Paulo, Piracicaba*. Tese de Mestrado - ESALQ - USP.
- [5] Cohen, Y. e Levy, Y. 1990. *Joint action of fungicides in mixtures: theory and practice*. Phytoparasitica 18(2):159-169.
- [6] Dekker, J. 1976. *Acquired resistance to fungicides*. Ann. Rev. Phytopathol. 14:405-428.
- [7] Dekker, J. 1982. *Can we estimate the fungicide-resistance hazard in the field from laboratory and greenhouse tests ?* In: Dekker, J. and Georgopoulos, S.G., eds. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p:128-138.
- [8] Delp, C.P. 1980. *Coping with resistance to plant disease control agents*. Plant Disease 64:652-657.
- [9] Edgington, L.V., Khew, K.L. e Barron, G.L. 1971 *Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds*. Phytopathology 61:42-44.
- [10] Finney, D.J. 1971 *Probit analysis*. 3rd ed. Cambridge. University Press.
- [11] Ghini, R. 1987. *Ocorrência e adaptabilidade de linhagens de Botrytis squamosa resistente a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas*. Tese de Doutorado - ESALQ - USP.

- [12] Ghini, R.; Vendite, L.L. e Petrucci, A.A. 1994. *Dosagens de fungicidas: avaliação de seus efeitos na resistência de fungos, através de um modelo matemático*. Fitopatol.bras. 19:514-519.
- [13] Hau, B. 1990. *Analytic models of plant disease in a changing environment* Annu. Rev. Phytopathol. 28:221-245.
- [14] Josepovits, G. 1989. *A model for evaluating factors affecting the development of insensitivity to fungicides*. Crop Protection 8:106-113.
- [15] Kable, P.F. e Jeffery, H. 1980. *Selection for Tolerance in Organisms Exposed to Sprays of Biocide Mixtures: A Theoretical Model*. Phytopathology 70:8-12.
- [16] Kimati, H. 1987. *Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento*. Agrotécnica 1:5-7.
- [17] Kimati, H. 1987. *Resistência de fitopatógenos a defensivos agrícolas*. Summa Phytopathologica 13:72-76.
- [18] Ko, W.H., Lin, H. e Kunimoto R.K. 1975. *A simple method for determining efficacy and wheatherability of fungicides on foliage*. Phytopathology 65:1023-1025.
- [19] Levy Y. e Levy R. S. 1986. *Control Strategies Using Systemic Fungicides for Limiting Disease Development and Resistance Buildup: Practical Implications of Simulation Model*. Phytoparasitica 14(4):303-312.
- [20] Skylakakis, G. 1981. *Effects of Alternating and Mixing Pesticides on the Buidup of Fungal Resistance*. Phytopathology 71:1119-1121.
- [21] Staub, T. e Sozzi, D. 1984 *Fungicide resistance: a continuing Challenge*. Plant Disease 68:(12) 1026-1031.
- [22] Van der Planck, J.E. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press, New York.