

# SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Botrytis cinerea* A FUNGICIDAS<sup>1</sup>

MAURO KOOZO KIMURA<sup>2</sup>  
PAULO ESTEVÃO DE SOUZA<sup>3</sup>  
HILÁRIO ANTÔNIO DE CASTRO<sup>3</sup>

**RESUMO** - Avaliou-se a sensibilidade *in vitro* de *Botrytis cinerea* proveniente de viveiro de eucalipto a fungicidas. O isolado demonstrou menor sensibilidade micelial aos fungicidas benomyl, tiofanato metílico, iprodione, procymidone e captan, e altamente sensível a tolilfluanid, tebuconazole, triadimenol, difenoconazole, propiconazole e cyproconazole, e insensível a azoxystrobin, quintozene, dimethomorph e dithianon. As misturas mais fungitóxicas foram tebuconazole com procymidone, captan e benomyl, e misturas contendo procymidone e/ou iprodione. Os fungicidas

tebuconazole, triadimenol, difenoconazole e propiconazole foram eficientes na inibição da germinação conidial. Os fungicidas triadimenol, tebuconazole, difenoconazole, propiconazole, cyproconazole, procymidone, iprodione, captan e tolilfluanid apresentaram fungitoxicidade na erradicação micelial. Os fungicidas tebuconazole e tolilfluanid apresentaram grande efeito fungitóxico na erradicação de escleródios. O isolado de *B. cinerea* adquiriu resistência ao fungicida benomyl e insensibilidade ao fungicida azoxystrobin.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Sensibilidade a fungicidas, resistência a fungicidas, *Botrytis cinerea*.

## *IN VITRO* SENSIBILITY OF *Botrytis cinerea* TO FUNGICIDES

**ABSTRACT** - In vitro tests were carried out to evaluate the sensitivity of *Botrytis cinerea* on nursery eucalyptus to fungicides. The isolate showed less mycelial sensitivity to the fungicidal benomyl, methyl tiophanate, iprodione, procymidone and captan. It was highly sensitive the tolilfluanid, tebuconazole, triadimenol, difenoconazole, propiconazole and cyproconazole, and insensitive to azoxystrobin, quintozene, dimethomorph and dithianon. The most fungitoxic were tebuconazole with procymidone, captan with benomyl, and mixtures with procymidone and/or

iprodione. The fungicides tebuconazole, triadimenol, difenoconazole and propiconazole were efficient in the inhibition of the germination conidial. Triadimenol, tebuconazole, difenoconazole, propiconazole, cyproconazole, procymidone, iprodione, captan and tolilfluanid presented fungitoxic effect in the mycelial eradication. Tebuconazole and tolilfluanid presented great fungitoxic in the sclerotium eradication. The isolate of *B. cinerea* was shown to be resistant to the fungicide benomyl and insensitive to the fungicide azoxystrobin.

**INDEX TERMS:** Fungicides, resistance, *Botrytis cinerea*.

### INTRODUÇÃO

O mofo-cinzeno e o tombamento-de-mudas, cujo agente etiológico é *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr, tem causado grandes perdas em viveiros de eucalipto (Ferreira, 1989). Atualmente, uma das medidas mais utilizadas na estratégia de manejo dessas doenças é o controle químico. Uma das preocupações quanto ao uso indiscriminado de fungicidas é a possibilidade de adaptação dos fungos, adquirindo, com isso,

resistência aos mesmos (Kimati, 1995). Atualmente não há fungicidas recomendados no Ministério da Agricultura para o controle de tombamento-de-mudas ou mofo-cinzeno, associado a *B. cinerea* na cultura do eucalipto no Brasil (Compêndio..., 1999). Por isso, utilizam-se as recomendações para outras culturas. Entretanto, o uso inadequado possibilita o aumento do risco do surgimento de formas resistentes do fungo a fungicidas.

1. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS (UFLA), Departamento de Fitopatologia, Caixa Postal 37 – 37200.000 – Lavras, MG.

2. Engenheiro Agrônomo M.Sc., Departamento de Fitopatologia/UFLA.

3. Engenheiro Agrônomo Dr.Sc., Professor do Departamento de Fitopatologia/UFLA.

Em culturas no campo, fungicidas protetores como captan, dichlofluanid, chlorotalonil, dicloran, dithiocarbamatos, e particularmente thiran, têm sido usados em pulverizações no controle do mofo-cinzento do morango. Folpet, captafol e methiram têm sido usados em mistura com outros fungicidas no controle do *B. cinerea* da videira (Maude, 1980). Após a introdução dos fungicidas sistêmicos no final de 1960, os fungicidas do grupo dos benzimidazóis foram os primeiros a serem usados no controle do mofo-cinzento (Maude, 1980; Smith, 1994). No final da década de 70, os fungicidas do grupo das dicarboximidas, como iprodione, vinclozolin e procymidone, foram intensivamente aplicados no controle de *B. cinerea* (Lorenz, 1994). Testes *in vitro* demonstraram alto nível de resistência de vários isolados *B. cinerea* a benomyl e baixo nível de resistência a iprodione e difenoconazole (Caldari Júnior, 1998). Monteiro (1996) relata a eficiência de tebuconazole e propiconazole na inibição micelial de *B. cinerea*, agente causal do mofo-cinzento da roseira. Entretanto, não demonstraram eficiência na inibição da germinação conidial. Ghini (1996) encontrou apenas 3 isolados sensíveis ao benomyl em 28 isolados de *B. cinerea*, coletados em casas-de-vegetação com plantas ornamentais. Por meio de muitos trabalhos, verificou-se a existência de linhagens de *B. cinerea* resistentes principalmente aos grupos químicos benzimidazóis (Smith, 1994) e dicarboximidas (Lorenz, 1994), podendo, em alguns casos, essa resistência ser para ambos os grupos químicos, sendo, então, denominada resistência cruzada (Northover & Matteoni, 1986; Kimati, 1995; Raposo *et al.*, 1996).

Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar a sensibilidade *in vitro* de *B. cinerea* a fungicidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a sensibilidade de *B. cinerea* a fungicidas, foram realizados testes *in vitro*, conduzidos no Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG. O isolado de *B. cinerea* foi obtido a partir de mudas de eucalipto apresentando sintomas típicos da doença, provenientes de um viveiro comercial situado em Mogi-Guaçu, SP.

Os fungicidas utilizados nos bioensaios foram: azoxystrobin (F1), tolilfluanid (F2), dodine (F3), triforine (F4), procymidone (F5), dimethomorph (F6), dithianon

(F7), imibenconazole (F8), captan (F9), folpet (F10), benomyl (F11), iprodione (F12), tebuconazole (F13), triadimenol (F14), difenoconazole (F15), propiconazole (F16), cyproconazole (F17), tiofanato metílico (F18) e quintozene (F19).

Para avaliar a sensibilidade micelial de *B. cinerea* a fungicidas, o bioensaio empregado foi o de incorporação de fungicidas no meio BDA (batata-dextrose-água) fundente, semelhante ao método descrito por Caldari Júnior (1998).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 77 tratamentos e 4 repetições. Utilizaram-se todos os fungicidas citados acima em 4 concentrações (1, 10, 100 e 1000 ppm) e mais a testemunha sem fungicida. Para avaliação, mediu-se o diâmetro do crescimento micelial em dois sentidos perpendiculares entre si. Os dados foram submetidos a uma análise de regressão, obtendo-se o ED<sub>50</sub> (concentração do ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial do isolado) e a concentração mínima inibitória (CMI) dos fungicidas. Os fungicidas foram classificados em quatro categorias de fungitoxicidade e sensibilidade *in vitro*, de acordo com a escala de Edgington *et al.* (1971) adaptada, em que:

- i) ED<sub>50</sub> < 1 ppm: alta fungitoxicidade (AE) e alta sensibilidade (AS)
- ii) ED<sub>50</sub> 1 - 10 ppm: modera fungitoxicidade (ME) e moderada sensibilidade (MS)
- iii) ED<sub>50</sub> 10 - 50 ppm: baixa fungitoxicidade (BE) e baixa sensibilidade (BS)
- iv) ED<sub>50</sub> > 50 ppm: não fungitóxico (I) e insensibilidade (IS).

Para avaliar a sensibilidade micelial de *B. cinerea* a misturas de fungicidas, o teste empregado foi o de incorporação de fungicidas no meio BDA fundente, semelhante à metodologia descrita por Caldari Júnior (1998), incorporando-se dois fungicidas.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos e 4 repetições no  $\bar{F}$  bioensaio. Os tratamentos foram os fungicidas: F13 misturados com F1, F2, F3, F4, F5, F9, F11, F12, F18, e F13 utilizado isoladamente, e mais a testemunha sem fungicida. No 2º bioensaio, utilizaram-se 11 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos foram: F12+F11, F12+F18, F12+F9, F12+F5, F11+F18, F11+F9, F11+F5, F18+F9, F18+F5, F9+F5. Nos dois bioensaios, utilizaram-se as concentrações de 1 e 100 ppm e mais a testemunha sem fungicida.

Após o período de incubação, avaliou-se o percentual de inibição do crescimento, medindo o diâmetro do crescimento micelial.

Para avaliar a sensibilidade de conídios de *B. cinerea* a fungicidas, o teste adotado foi o da diluição de fungicidas em água destilada, mais a suspensão conidial. Foi empregada a metodologia descrita por Davis & Dennis (1981); porém, com uma suspensão conidial de  $1,0 \times 10^4$  conídios/ml, e incubação de 16 horas no escuro, sob temperatura ambiente (20-25°C).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 52 tratamentos e 4 repetições. Utilizaram-se para os tratamentos os seguintes fungicidas: F1, F2, F3, F5, F9, F11, F12, F13, F14, F15, F16, F18, em 4 concentrações (1, 10, 50 e 100 ppm) e a testemunha em água destilada sem fungicida. Para avaliação da inibição da germinação, determinou-se a porcentagem de conídios germinados, com base em 100 conídios avaliados.

Na erradicação de micélio de *B. cinerea*, utilizou-se o teste de contato micelial com a calda fungicida semelhante à descrita por Souza (1991). Desenvolveu-se o crescimento micelial em meio BDA a 3% e, em seguida, o novo micélio desenvolvido na fina camada (película) de BDA foi tratado com 10 ml dos fungicidas preparado em água destilada esterilizada. Após dois minutos de tratamento, a suspensão fungicida foi descartada e cinco discos de 7 mm de diâmetro da película micelial foram transferidos para placas de Petri contendo BDA a 2%, e incubadas por 4 dias em câmara de crescimento sob temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 29 tratamentos em 3 repetições, sendo uma placa com 5 discos da película micelial por parcela. Utilizaram-se os seguintes fungicidas: F1, F2, F3, F4, F5, F9, F11, F12, F13, F14, F15, F16, F17 e F18, em duas concentrações de 100 e 1000 ppm, mais a testemunha sem tratamento fungicida. As avaliações foram realizadas contando-se o número de colônias originadas a partir dos discos de película micelial tratados.

Para o teste de erradicação de escleródios de *B. cinerea*, foi empregada a metodologia descrita por Souza (1991) com algumas modificações. Os escleródios produzidos foram retirados com o auxílio de uma pinça, cortados em pequenos pedaços com uma lâmina de aço inoxidável e transferidos para tubos de ensaio (15x1,5cm) contendo a calda fungicida previamente diluída em água destilada esterilizada.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 37 tratamentos em 4 repetições, sendo 5 escleródios por parcela. Como tratamentos, utilizaram-se os seguintes fungicidas: F1, F2, F3, F4, F5, F9, F12, F13 e F15, em 4 concentrações (100, 500, 1000 e 2000 ppm), e a testemunha (escleródios não tratados com fungicidas). Após três dias de incubação, realizou-se a avaliação, determinando-se a porcentagem de escleródios que não germinaram.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Sensibilidade micelial de *B. cinerea* a fungicidas

Os resultados da sensibilidade micelial de *B. cinerea* a fungicidas encontram-se na Tabela 1. O isolado foi sensível aos fungicidas do grupo dos DMI's (inibidores de reação de demetilação). O fungo apresentou alta sensibilidade ao tebuconazole, propiconazole e imibenconazole, com  $ED_{50}$  (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial) menor que 1 ppm. Resultados semelhantes foram encontrados por Ghini (1996) para o triazol propiconazole quando o  $ED_{50}$  ficou abaixo de 1 ppm, com pequena insensibilidade para alguns isolados, com concentração mínima inibitória (CMI) de 100 ppm. A CMI do propiconazole utilizado neste ensaio variou de 1 a 10 ppm, tendo esse fungicida maior potencial no controle do *B. cinerea* do que o fungicida tebuconazole, com CMI entre 100 e 1000 ppm. O fungicida imibenconazole não foi eficiente na inibição micelial de *B. cinerea*. A CMI desse produto foi superior a 1000 ppm. Esse resultado assemelha-se ao obtido por Yamashita *et al.* (1997), que verificaram o crescimento micelial de *B. cinerea* em meio de cultura com 1000 ppm de imibenconazole. Para outros fungicidas DMI's, o isolado comportou-se com moderada sensibilidade, como para os fungicidas difenoconazole, cyproconazole, triadimenol e triforine, com o  $ED_{50}$  variando de 1 a 10 ppm. Caldari Júnior (1998) encontrou o mesmo resultado para o triazol difenoconazole, verificando extrema sensibilidade dos isolados ao fungicida, mas alguns isolados foram insensíveis, desenvolvendo no meio com 100 e/ou 1000 ppm do fungicida. Esses resultados referentes aos fungicidas DMI's podem selecionar linhagens resistentes, não sendo segura a utilização individual de um triazol, principalmente quando utilizados em sistemas de produção altamente intensivos, como em casas-de-vegetação. De acordo com Stehmann & De Waard (1996), a seleção de

mutantes resistentes pelos triazóis pode limitar o uso de triazóis no controle de *B. cinerea*.

Dentre os fungicidas continuamente aplicados sobre o patógeno em estudo, o isolado foi altamente sensível aos fungicidas iprodione e procymidone, com ED<sub>50</sub> calculado < 1 ppm. Porém, os fungicidas procymidone e iprodione permitiram o crescimento micelial em altas concentrações, com a CMI acima de 1000 ppm, indicando uma provável adaptação do isolado à pressão de seleção dos fungicidas. Resultados semelhantes foram encontrados por Ghini (1996), quando a maioria dos isolados avaliados tiveram o seu ED<sub>50</sub> abaixo de 1 ppm, porém com concentração mínima inibitória de 100 ppm. O fungo comportou-se com baixa sensibilidade ao fungicida benomyl, com ED<sub>50</sub> entre 10 e 50 ppm, e para os fungicidas tiofanato metílico e captan, o isolado comportou-se como insensível, com ED<sub>50</sub> acima de 50 ppm. A insensibilidade do isolado aos fungicidas benomyl e tiofanato metílico confirmam a ocorrência de resistência cruzada para esse grupo de fungicidas, com abundante desenvolvimento micelial na concentração de 1000 ppm do fungicida no meio BDA, demonstrando alto nível de resistência. Resultados

semelhantes foram encontrados por Ghini (1996) e Moorman & Lease (1992), que encontraram isolados com resistência cruzada aos fungicidas do grupo dos benzimidazóis.

Para os fungicidas ainda não utilizados no controle desse isolado, o fungo foi altamente sensível ao tolilfluanid, com ED<sub>50</sub> < 1 ppm. Malathrakis (1989) detectou isolado resistente ao dichlofluanid na concentração de 81 ppm, o qual é um produto similar ao tolilfluanid (Correio..., 1995). Para os fungicidas dodine e quintozene, o fungo comportou-se com moderada sensibilidade, com valores do ED<sub>50</sub> entre 1 e 10 ppm. O fungo demonstrou insensibilidade para os fungicidas folpet, dithianon, azoxystrobin e dimethomorph, com ED<sub>50</sub> > que 50 ppm. Para o fungicida azoxystrobin do grupo das estrobilurinas, Caldari Júnior. (1998) encontrou variação no crescimento micelial de isolados *B. cinerea* ainda não expostos a esse fungicida. Mesmo em altas concentrações, os fungicidas azoxystrobin, folpet, dithianon, quintozene e dimethomorph não inibiram o crescimento do fungo, agindo como não-fitotóxicos.

**TABELA 1** - Equações de regressão, valores médio de ED<sub>50</sub> (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial), eficiência e sensibilidade de *Botrytis cinerea* a fungicidas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fungicidas	Equações da Regressão	R <sup>2</sup>	ED <sub>50</sub>	S <sup>1)</sup>	E <sup>2)</sup>	CMI <sup>3)</sup> (ppm)
Difenoconazole	Y=1.2516x <sup>2</sup> -14.6865x+50.1880	0.95	1.43	MS	MF	100-1000
Tebuconazole	Y=0.8804x <sup>2</sup> -9.0911x+28.2175	0.95	< 1	AS	AF	10-100
Cyproconazole	Y=1.5229x <sup>2</sup> -16.8175x+50.6069	0.95	1.41	MS	MF	10-100
Triadimenol	Y=1.5219x <sup>2</sup> -16.9621x+51.8745	0.95	1.52	MS	MF	100-1000
Propiconazole	Y=1.0087x <sup>2</sup> -10.0161x+28.7832	0.95	< 1	AS	AF	1-10
Triforine	Y=-0.5149x <sup>2</sup> -3.3420x+50.7558	0.95	4.11	MS	MF	100-1000
Imibenconazole	Y=0.9588x <sup>2</sup> -9.9274x+37.4954	0.95	< 1	AS	AF	> 1000
Tiofanato Metílico	Y=0.3039x <sup>2</sup> -2.3857x+90.8496	0.95	> 1000	I	NF	> 1000
Benomyl	Y=0.7787x <sup>2</sup> -12.5315x-72.1760	0.95	13.24	BS	BF	> 1000
Procymidone	Y=0.5843x <sup>2</sup> -5.6650x+37.2865	0.95	< 1	AS	AF	> 1000
Iprodione	Y=0.8189x <sup>2</sup> -5.7655x+42.9041	0.95	< 1	AS	AF	> 1000
Captan	Y=-3.0573x <sup>2</sup> +14.2356x+56.7544	0.95	215.28	I	NF	> 1000
Dimethomorph	Y=-1.4963x <sup>2</sup> +9.7692x+55.1508	0.95	> 1000	I	NF	> 1000
Tolilfluanid	Y=1.4828x <sup>2</sup> -15.2931x+42.6173	0.95	< 1	AS	AF	10-100
Folpet	Y=-3.3493x <sup>2</sup> +14.9335x+75.7800	0.95	404.16	I	NF	> 100
Dithianon	Y=-3.7202x <sup>2</sup> +22.2539x+51.1735	0.95	516.73	I	NF	> 100
Azoxystrobin	Y=-2.2182x <sup>2</sup> +15.6961x+54.8881	0.95	> 1000	I	NF	> 100
Dodine	Y=0.6662x <sup>2</sup> -10.9364x+51.6288	0.95	1.87	MS	MF	100-1000
Quintozene	Y=0.7100x <sup>2</sup> -8.6055x+55.7338	0.95	4.10	MS	MF	> 1000

1) AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível)

2) AE (alta fungitoxicidade), ME (moderada fungitoxicidade), BE (baixa fungitoxicidade), NF (não fungitóxico)

### 3) Intervalo de concentração mínima inibitória

Vários pesquisadores relatam a eficiência de fungicidas benzimidazóis (Smith, 1994) e dicarboximidas (Lorenz, 1994) sobre *B. cinerea*. Essa não-correlação de fungitoxicidade *in vitro* e eficiência *in vivo* pode estar relacionada à resistência do isolado aos fungicidas. Esse isolado estudado sofreu grande pressão de seleção por fungicidas benzimidazóis e dicarboximidas no campo; por isso, demonstrou-se insensível *in vitro*, diminuindo a fungitoxicidade *in vivo*.

#### Sensibilidade micelial de *B. cinerea* a misturas de fungicidas

Os resultados da sensibilidade micelial de *B. cinerea* em meio BDA com misturas de fungicidas estão apresentados na Tabela 2.

Verifica-se que com 1 ppm dos fungicidas utilizados em mistura com 1 ppm do fungicida tebuconazole, quando comparados com o fungicida tebuconazole utilizado isoladamente, a mistura de tebuconazole com azoxystrobin, triforine, tiofanato metílico, benomyl, captan e procymidone não diferiu significativamente. Quando compararam-se os fungicidas aplicados isoladamente e os fungicidas misturados com tebuconazole, nota-se que para os fungicidas captan, procymidone e benomyl ocorreram interações positivas. Essa interação pode ser observada pelo aumento da inibição micelial ser superior ao do fungicida tebuconazole e dos fungicidas aplicados isoladamente. Isso indica que os modos de ação dos fungicidas utilizados na mistura agem de forma independente. Os fungicidas azoxystrobin e tiofanato metílico não foram eficientes, e a inibição micelial pode ter sido causada pelo fungicida tebuconazole. Para os fungicidas triforine, dodine, tolilfluanid e iprodione, ocorreram efeitos negativos, pois houve decréscimo na inibição do crescimento micelial quando comparados com o fungicida tebuconazole. O efeito negativo pode ser devido ao impedimento da ação do fungicida tebuconazole ou vice-versa, relacionado à auto-incompatibilidade entre os ingredientes ativos. Na concentração de 100 ppm, todas as misturas com tebuconazole foram fungitóxicas ao crescimento micelial, não podendo dizer se ocorreu interação positiva ou negativa, ou seja, se houve compatibilidade ou incompatibilidade entre os ingredientes ativos. Pelos resultados, constata-se que nem sempre a mistura de

dois fungicidas aumenta a eficiência dos fungicidas, apesar de aumentar o custo da aplicação.

Quanto à avaliação das misturas contendo 1 ppm de cada fungicida, normalmente aplicados sobre o patógeno em estudo, observa-se que as misturas que contêm o fungicida procymidone a 1 ppm são altamente fungitóxicas ao crescimento micelial de *B. cinerea*. Uma alta fungitoxicidade ao crescimento micelial foi demonstrada com 100 ppm das misturas fungicidas, que contêm iprodione e/ou procymidone. Com esse resultado pode-se afirmar que os fungicidas do grupo dos dicarboximidas mantiveram a fungitoxicidade, apesar de o isolado já ter entrado em contato com esse grupo de fungicida. Apesar da provável resistência do isolado aos benzimidazóis, o isolado foi sensível ao dicarboximidas. As misturas entre benomyl, tiofanato metílico e captan proporcionam pouca inibição do crescimento micelial do fungo em 1 e 100 ppm, comprovando que esse isolado provavelmente tenha adquirido resistência aos fungicidas benomyl e tiofanato metílico, e esses interferem no modo de ação do captan quando são misturados.

#### Sensibilidade de conídios de *B. cinerea* a fungicidas

Os conídios tratados com os fungicidas benomyl e azoxystrobin mantiveram níveis constantes de germinação em todas as concentrações avaliadas (Tabela 3). Para o fungicida azoxystrobin, provavelmente o fungo seja naturalmente insensível, não sendo afetado em nenhuma rota metabólica vital. Para o fungicida benomyl, o fungo tornou-se insensível, adquirindo resistência pela mutação do gene que confere a sensibilidade a esse fungicida, citado por Davidse (1994). Para procymidone e tiofanato metílico, à medida que aumentaram as concentrações, ocorreu decréscimo na germinação conidial. Provavelmente os fungicidas procymidone e tiofanato metílico devido a pouca utilização no controle desse patógeno nesta área, não houve tempo suficiente para o patógeno adquirir resistência a esse fungicida. Os fungicidas iprodione e procymidone foram fungitóxicos para a germinação conidial, o mesmo ocorrendo com os fungicidas protetores captan, tolilfluanid e dodine. Grande poder de inibição da germinação, foi demonstrado pelos fungicidas tebuconazole, difenoconazole, triadimenol e propiconazole. Monteiro (1996) demonstrou que

propiconazole não teve efeito na germinação de conídios de *B. cinerea*, e tebuconazole demonstrou 25% de germinação conidial. Provavelmente o isolado utilizado pelo autor teve contato com esses fungicidas. Pode-se observar que alguns fungicidas sistêmicos agem também de forma protetora, evitando a germinação de conídios.

#### Erradicação micelial de *B. cinerea* por fungicidas

Os resultados da erradicação micelial do isolado de *B. cinerea* podem ser observados na Tabela 4. Os

fungicidas protetores nas concentrações avaliadas foram efetivos em inibir o crescimento micelial sobre o meio de cultura BDA. Captan e tolilfluanid demonstraram potencial na erradicação de *B. cinerea* nas concentrações entre 100 e 1000 ppm, podendo ser utilizados no tratamento de partes vegetais, erradicando micélio fúngico localizado na parte externa, e agindo de forma protetora e erradicante.

**TABELA 2** - Percentual de inibição micelial de *Botrytis. cinerea* por misturas de fungicidas com tebuconazole e entre misturas de fungicidas nas concentrações de 1 e 100 ppm. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Tratamentos	Concentrações				Tratamentos	Concentrações				
	1 ppm		100 ppm			1 ppm		100 ppm		
Azoxystrobin Tebuconazole	+	74.64	cde <sup>1)</sup>	100.00	a	Tebuconazole	72.74	cde	100.00	e
Captan + Tebuconazole		100.0	e	100.00	a	Azoxystrobin	53.91	c	15.36	a
Procymidone Tebuconazole	+	91.54	e	100.00	a	Captan	46.83	bc	51.35	b
Triforine + Tebuconazole		47.65	abcde	100.00	a	Procymidone	62.95	c	79.82	cde
Dodine + Tebuconazole		28.87	ab	100.00	a	Triforine	52.26	bc	93.37	de
Tolilfluanid + Tebuconazole		26.52	a	100.00	a	Dodine	43.97	bc	85.99	cde
Tiof. Metílico Tebuconazole	+	67.60	bcde	100.00	a	Tolilfluanid	54.06	c	100.00	e
Benomyl + Tebuconazole		84.97	de	100.00	a	Tiof. Metílico	0.15	a	8.28	a
Iprodione + Tebuconazole		44.13	abc	97.83	a	Benomyl	20.18	ab	70.63	bc d
-	-	-	-	-	-	Iprodione	53.91	c	61.14	bc
CV (%)		21.62		0.86		CV (%)	29.82		15.66	

Tratamentos	Concentrações				Tratamentos	Concentrações			
	1 ppm		100 ppm			1 ppm		100 ppm	
Iprodione + Captan	29.65	a <sup>1)</sup>	97.31	d	Procymidone	62.95	c	79.82	b
Iprodione + Tiofanato metílico	43.53	b	95.11	d	Iprodione	53.91	c	61.14	b
Iprodione + Procymidone	98.58	c	91.16	d	Captan	46.83	bc	51.35	b
Iprodione + Benomyl	46.21	b	98.89	d	Benomyl	20.18	ab	70.63	b

Benomyl + Captan <sup>2)</sup>	0.00	-	47.31	c	Tiofanato metílico	0.15	a	8.28	a
Benomyl + Tiofanato metílico <sup>2)</sup>	0.00	-	10.56	a	-	-	-	-	-
Procymidone + Captan	97.16	c	98.76	d	-	-	-	-	-
Procymidone + Tiof. metílico	99.52	c	98.45	d	-	-	-	-	-
Tiofanato metílico + Captan <sup>2)</sup>	0.00	-	30.91	b	-	-	-	-	-
CV (%)	4.86		4.30		CV (%)	36.80		25.68	

1) Média seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

2) Excluídos da análise estatística.

**TABELA 3** - Percentagem de conídios germinados de *Botrytis cinerea* e intervalo de confiança exato para a variável binomial de conídios germinados. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Tratamentos	Concentrações (ppm)			
	1	10	50	100
Testemunha <sup>1)</sup>	76.75 <sup>2)</sup>	73	75	76.25
	0.675 <sup>3)</sup> - 0.847 e <sup>4)</sup>	0.631 - 0.813 d	0.653 - 0.831 c	0.664 - 0.839 c
Tebuconazole	1.75	0	0	0
	0.002 - 0.070 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a
Triadimenol	32	0	0	0
	0.230 - 0.420 b	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a
Difenoconazole	0	0	0	0
	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a
Propiconazole	23.75	0	0	0
	0.160 - 0.335 b	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a
Iprodione	86.25	3.5	0	0
	0.776 - 0.921 e	0.011 - 0.099 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a
Azoxystrobin	40	46.5	35	36.5
	0.303 - 0.502 bc	0.359 - 0.562 c	0.257 - 0.451 b	0.266 - 0.462 b
Benomyl	71.50	96	59	49.5
	0.621 - 0.805 de	0.900 - 0.988 e	0.487 - 0.687 c	0.398 - 0.601 b
Captan	93	0	0	0
	0.861 - 0.971 ef	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a
Tiof. Metílico	53.75	38.25	16.75	8.5
	0.437 - 0.640 cd	0.284 - 0.482 c	0.102 - 0.258 b	0.035 - 0.151 a

Tolilfluanid	0	0	0	0
	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a
Dodine	85.75	6.0	0	0
	0.776 - 0.921 e	0.022 - 0.126 ab	0.000 - 0.036 a	0.000 - 0.036 a
Procymidone	28.25	17.25	19.25	3.25
	0.194 - 0.378 b	0.102 - 0.258 b	0.118 - 0.280 b	0.006 - 0.085 a

1\ Tratamento utilizado como testemunha, total de 400 conídios avaliados. 2\ dados originais. 3\ intervalo de confiança inferior e superior. 4\ tratamentos com letras diferentes nas colunas, diferem estatisticamente a 95% de probabilidade

**TABELA 4** – Porcentagem de erradicação micelial de *Botrytis cinerea*, após tratamento com fungicidas e intervalo de confiança exa to para a variável binomial da erradicação micelial. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Tratamento	Concentrações			
	100 ppm		1000 ppm	
Testemunha	0		0	
	0.0000 <sup>41</sup> – 0.0362	d <sup>21</sup>	0.0000 – 0.0362	e
Azoxystrobin	0		0	
	0.0000 – 0.0362	d	0.0000 – 0.0362	e
Benomyl	26.66		6.66	
	0.1860 – 0.3680	bc	0.0286 – 0.1389	d
Iprodione	26.66		93.33	
	0.1860 – 0.3680	bc	0.8610 – 0.9713	a
Procymidone	33.33		93.33	
	0.2391 – 0.4311	b	0.8610 – 0.9713	a
Captan	93.33		100	
	0.8610 – 0.9713	a	0.9637 – 1.0000	a
Tiof. Metílico	0		0	
	0.0000 – 0.0362	d	0.0000 – 0.0362	e
Tolilfluanid	40		86.66	
	0.3032 – 0.5027	b	0.7879 – 0.9289	b
Triadimenol	0		0	
	0.0000 – 0.0362	d	0.0000 – 0.0362	e
Tebuconazole	0		100	
	0.0000 – 0.0362	d	0.9637 – 1.0000	a
Difenoconazole	0		100	
	0.0000 – 0.0362	d	0.9637 – 1.0000	a



Propiconazole	0		100	
	0.0000 – 0.0362	d	0.9637 – 1.0000	a
Cyproconazole	0		40	
	0.0000 – 0.0362	d	0.3032 – 0.5027	c
Triforine	0		0	
	0.0000 – 0.0362	d	0.0000 – 0.0362	e
Dodine	0		60	
	0.0000 – 0.0362	d	0.4972 – 0.6967	c

1\ intervalo de confiança inferior e superior. 2\ tratamentos com letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente a 95% de probabilidade

Os fungicidas tebuconazole, propiconazole e difenoconazole possuem eficiência na proteção e erradicação de crescimento micelial de *B. cinerea*, nas concentrações entre 100 e 1000 ppm. Esses triazóis possuem potencial de erradicar partes vegetais infectados pelo micélio fúngico localizado na parte externa e interna do órgão vegetal, e agindo de forma protetora e erradicante. Entretanto, os fungicidas triadimenol, triforine e cyproconazole não possuem o efeito erradicante contra o crescimento micelial. Isso demonstra que existe algum diferencial na constituição da molécula do triazol, tornando-o mais ativo ou não. Os fungicidas do grupo das dicarboximidás (iprodone e procymidone) foram fungitóxicos para prevenir e erradicar o crescimento micelial do fungo. Resultado semelhante foi obtido por Souza (1991) na erradicação do micélio de *B. cinerea* com 200 ppm de procymidone. A ineficiência dos fungicidas benomyl e tiofanato metílico pode estar relacionada à resistência do fungo a

esses fungicidas e à insensibilidade natural ao azoxystrobin.

#### Erradicação e/ou inviabilização dos escleródios de *B. cinerea*

Os resultados da erradicação e/ou inviabilização dos escleródios podem ser vistos na Tabela 5. A melhor fungitoxicidade demonstrada por tolilfluanid pode estar relacionada à similaridade do modo de ação entre captan e dichlofluanid (Rewal *et al.*, 1991), a qual é similar ao tolilfluanid. A maior fungitoxicidade apresentada por tolilfluanid pode estar relacionada ao fato de o isolado não ter tido contato com esse fungicida. A menor sensibilidade de escleródios do isolado ao captan pode estar relacionada à resistência ou adaptabilidade ao captan, pois esse isolado foi proveniente de área com intensivas aplicações do captan.

**TABELA 5** – Percentual de escleródios de *Botrytis cinerea* não germinados após tratamento com fungicidas e intervalo de confiança exato para a variável binomial de escleródios não germinados. UFLA, Lavras – MG, 1999.

Tratamentos	Concentrações (ppm)							
	100		500		1000		2000	
Testemunha	0		0		0		0	
	0.000 <sup>1</sup> -0.036	b <sup>2</sup>	0.000-0.036	c	0.000-0.036	c	0.000-0.036	d
Tolilfluanid	100		100		100		54.77	
	0.963-1.000	a	0.963-1.000	a	0.963-1.000	a	0.447-0.649	b
Benomyl	0		0		0		0	
	0.000-0.036	b	0.000-0.036	c	0.000-0.036	c	0.000-0.036	d
Captan	95.45		43.19		40.40		10	

	0.887-0.983	a	0.331-0.532	b	0.303-0.502	b	0.049-0.176	c
Iprodione	0		0		0		0	
	0.000-0.036	b	0.000-0.036	c	0.000-0.036	c	0.000-0.036	d
Procymidone	0		0		0		0	
	0.000-0.036	b	0.000-0.036	c	0.000-0.036	c	0.000-0.036	d
Triforine	0		0		0		0	
	0.000-0.036	b	0.000-0.036	c	0.000-0.036	c	0.000-0.036	d
Dodine	0		94.45		60.45		100	
	0.000-0.036	b	0.873-0.977	a	0.497-0.696	b	0.963-1.000	a
Difenoconazole	0		0		0		0	
	0.000-0.036	b	0.000-0.036	c	0.000-0.036	c	0.000-0.036	d
Tebuconazole	0		100		100		100	
	0.000-0.036	b	0.963-1.000	a	0.963-1.000	a	0.963-1.000	a
Azoxystrobin	0		0		0		0	
	0.000-0.036	b	0.000-0.036	c	0.000-0.036	c	0.000-0.036	d

1\ limite inferior e superior. 2\ tratamentos com letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente a 95% de probabilidade.

Dentre os fungicidas sistêmicos, destacou-se o fungicida tebuconazole, inviabilizando a germinação dos escleródios em concentrações a partir de 500 ppm. Os outros fungicidas sistêmicos (benomyl, iprodione, procymidone, difenoconazole, triforine e azoxystrobin) não demonstraram fungitoxicidade para a inviabilização dos escleródios, permitindo a germinação dos escleródios em todas as concentrações. A não-fungitoxicidade dos fungicidas benomyl, iprodione e procymidone pode estar relacionada à resistência do isolado a esses fungicidas. Pode ser a resistência “física” dos escleródios aos fungicidas sistêmicos, que age de forma sistêmica e não por contato, ou seja, o fungicida tem que mover-se ou penetrar dentro dos escleródios, causando efeito fungitóxico. Apesar de ser do mesmo grupo químico, tebuconazole foi superior ao difenoconazole. Esse fato pode estar relacionado à mobilidade e translocação do fungicida (Forcelini, 1994).

### CONCLUSÕES

a) Isolado de *Botrytis cinerea* em estudo demonstrou menor sensibilidade aos fungicidas benomyl, tiofanato metílico, iprodione, procymidone e captan.

b) Dentre os fungicidas do grupo dos inibidores de reação de demetilação (DMI's), somente os triazóis tebuconazole, triadimenol, difenoconazole, propiconazole e cyproconazole demonstraram alta fungitoxicidade ao crescimento micelial de *B. cinerea*.

c) Fungicida protetor tolilfluandid demonstrou alta fungitoxicidade a *B. cinerea*, em todos os parâmetros *in vitro* avaliados.

d) Isolado de *B. cinerea* demonstrou insensibilidade aos fungicidas dithianon, dimethomorph, quintozene, folpet e azoxy strobin.

e) Os fungicidas dodine, triforine e imibenconazole apresentaram potencial na inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*.

f) As misturas de fungicidas envolvendo tebuconazole apresentaram alta fungitoxicidade ao crescimento micelial de *B. cinerea*.

g) Misturas entre benomyl, tiofanato metílico e captan foram ineficazes na inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*.

h) As misturas contendo procymidone e/ou iprodione são fungitóxicas ao crescimento micelial de *B. cinerea*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais.** 1998. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

COMPÊNDIO de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 6. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1999. 672 p.

- CORREIO AGRÍCOLA – BAYER. São Paulo: Bayer, ago./dez. 1995.
- DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and resistance. In: DELP, C.J. **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. chapt. 3, p.25-27.
- DAVIS, R.P.; DENNIS, C. Studies on the survival and infective ability of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea*. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.98, p.395-402, Apr. 1981.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, p.42-44, Jan. 1971.
- FERREIRA F.A. **Patologia florestal: principais doenças no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.
- FORCELINI, C.A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I Triazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.335-355, 1994.
- GHINI, R. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.285-288, jun. 1996.
- KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.46-95.
- LORENZ, G. Dicarboximide fungicides: history of resistance development and monitoring methods. In: DELP, C.J. **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. chapt. 4, p.45-51.
- MALATHRAKIS, N.E. Resistance of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in greenhouse vegetables. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, n.2, p.138-141, Feb. 1989.
- MAUDE, R.B. Disease control. In: COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W.R. **The biology of Botrytis**. New York: Academic Press, 1980. chapt. 10, p.275-308.
- MONTEIRO, A.J.A. **Avaliação da remoção de restos culturais e de fungicidas na intensidade do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casas-de-vegetação**. 1996. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MOORMAN, G.W.; LEASE, R.J. Benzimidazole - and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, p.477-480, Apr. 1992.
- NORTHOVER, J.; MATTEONI, J.A. Resistance of *Botrytis cinerea* to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouse after exposure to the fungicides alone or mixed with captan. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, p.398-402, Apr. 1986.
- RAPOSO, R.; DELCAN, J.; GOMEZ, V.; MELGAREJO, P. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. **Plant Pathology**, Oxford, v.45, p.497-505, June 1996.
- REWAL, N.; COLEY-SMITH, J.R.; SEALY-LEWIS, H.M. Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*. **Plant Pathology**, Oxford, v.40, p.554-560, Dec.1991.
- SMITH, C.M. Benzimidazole fungicides. In: DELP, C. J. (Ed.). **Fungicide resistance in North America**. 2.ed. St. Paul: APS Press, 1994. chapt. 3, p.23-44.
- SOUZA, M.G. **Etiologia e controle do tombamento de mudas de eucalipto, causado por Botrytis cinerea, no estádio de fechamento de canteiros**. 1991. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- STEHMANN, C.; DE WAARD, M.A. Biological activity of triazole fungicides towards *Botrytis cinerea*. In: LYR, H.; RUSSELL, P.E.; SISLER, H.D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. chapt. 15, p.125-128.
- YAMASHITA, R.T.; KIMURA, M.K.; GUALBERTO, B.D.; CASTRO, H.A.; MILANI, D.; LEITE, E.A.G.; CARDOSO, M.A.F.C. Inibição do crescimento micelial “in vitro” de *Botrytis* sp., causador do mofo cinzento de estacas e micro estacas de eucalipto (*Eucaliptus* sp), por fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22 (suplemento), p.320, ago. 1997.

