

RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS DE *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries, FUNGO CAUSADOR DE TOMBAMENTO EM MUDAS DE *Eucalyptus* sp. EM VIVEIROS FLORESTAIS

RESISTANCE TO FUNGICIDES OF *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries, CAUSAL AGENT OF EUCALYPT SEEDLING DAMPING OFF IN FOREST NURSERIES

Julio César Medeiros da Silva¹ Lísias Coelho²

RESUMO

A ocorrência de isolados de *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries, agente causal do tombamento em mudas de *Eucalyptus* spp., resistentes aos fungicidas sistêmicos benomil, procimidone e thiabendazole, foi avaliada verificando-se o efeito de doses crescentes dos fungicidas sobre o desenvolvimento micelial e a germinação de conídios do referido fitopatógeno. Os experimentos foram conduzidos em laboratório da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os tratamentos foram constituídos de quatro dosagens de cada fungicida (dose zero, meia dose, dose inteira e dose dupla). As análises foram realizadas sobre os valores de crescimento micelial obtidos no quinto dia, quando a testemunha atingiu o máximo crescimento, e 24 e 48 horas, para a verificação da percentagem de germinação de conídios. Para avaliação da resistência, compararam-se os resultados obtidos em dois isolados de *B. cinerea*, um proveniente de um viveiro comercial no Rio Grande do Sul (IB-1) e outro isolado (IB-2), obtido junto ao Departamento de Fitotecnia da UFSM. Os resultados mostraram que o isolado IB-1 cresceu e germinou sob todas as concentrações de benomil, enquanto o isolado IB-2 foi inibido em todas as concentrações, indicando que o primeiro isolado é resistente a benomil.

Palavras-chave: resistência, crescimento micelial, germinação, conídios.

ABSTRACT

The occurrence of fungicide resistant isolates of *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries causal agent of Eucalypt seedling damping off, was evaluated in laboratory tests conducted at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). To evaluate the fungicide effects on the mycelium growth and conidium germination, three active ingredients were tested: benomyl, procimidone and thiabendazole. The treatments consisted of four dosages for each fungicide: zero (control), one half of the recommended dosage, full dosage and twice the dosage. The evaluations were done every 24 hours during 7 days for the mycelium growth, and at 24 and 48 hours for spore germination. To determine the occurrence of resistance two isolates were compared, one from a commercial nursery in Rio Grande do Sul (IB-1), and the other (wild) (IB-2) from the Vegetable Crops Department, UFSM, Santa Maria, RS. The isolate IB-1 grew on all concentrations of benomyl, while the wild isolate was inhibited at all concentrations, indicating that the first isolate was resistant to benomyl.

Key words: resistance, mycelium growth, germination, conidia.

INTRODUÇÃO

A produção contínua de mudas em viveiros permanentes propicia a presença constante de fungos causadores de tombamento de mudas (Figliolia e Piña-Rodrigues, 1995). O tombamento de mudas em viveiros se caracteriza pela destruição das sementes em germinação (pré-emergência), e/ou plântulas recém emergidas, atacando seus tecidos ainda tenros e suculentos (pós-emergência). Os sintomas no eucalipto são caracterizados pela ocorrência de lesão na região do colo a qual pode se estender a alturas variáveis no hipocótilo, com aspecto encharcado no início e depois adquirindo coloração escura, resultante da degradação dos tecidos que provoca o tombamento e a morte da muda. Murcha, enrolamento e seca dos cotilédones e das primeiras folhas verdadeiras podem ser notados como sintomas secundários da doença, dependendo da idade e do tamanho das mudas (Krügnner, 1980). Essa doença é atribuída a fungos de solo como: *Cylindrocladium* sp., *Botrytis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Pythium* sp. (Ferreira, 1989).

1. Engenheiro Florestal, M.Sc., Professor do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade da Região da Campanha, CEP: 97300-000, São Gabriel (RS).
2. Engenheiro Florestal, Ph.D., Professor, Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), Campus Umuarama. Universidade Federal de Uberlândia, CEP: 38400-902, Uberlândia (MG). lisias@iciag.ufu.br / coelho@ig.com.br

Recebido para publicação em 19/03/2001 e aceito em 3/09/2003.

Botrytis cinerea Persoon ex Fries, um dos agentes causais do tombamento de mudas, é parasita facultativo e apresenta vasta gama de hospedeiros que inclui eucalipto e plantas de importância agrônômica. É habitante normal do solo onde pode sobreviver saprofiticamente ou por meio de estruturas de repouso denominadas escleródios (Krügener, 1980). Em condições de temperatura e umidade favoráveis, os escleródios germinam, produzindo hifas capazes de colonizar tecidos orgânicos vegetais vivos ou mortos e produzir conidióforos e conídios. Os conídios de *Botrytis cinerea* são diminutos, secos, facilmente disseminados pelo vento ou pela água. Em condições favoráveis de ambiente, os conídios podem germinar e colonizar o material vegetal vivo ou morto. A penetração é direta através das paredes celulares da epiderme da raiz ou do hipocótilo, com a subsequente colonização dos tecidos da muda que acabam por ser degradados pela ação de enzimas e/ou toxinas (Krügener, 1980). Infecções de *Botrytis* ocorrem somente no estágio de fechamento de canteiros, sendo este, inclusive, o patógeno predominante nesse estágio (Ferreira, 1989).

O tombamento de mudas é uma doença de importância limitada a viveiros de eucalipto e outras essências florestais. Os prejuízos que a doença causa dependem da intensidade do ataque que, por sua vez, é função das condições ambientais e da técnica usada para a formação das mudas. Em sementeiras para produção de mudas, que serão repicadas para recipientes, a ocorrência de ataques severos é maior que em mudas formadas pela semeadura direta em recipientes. Como a doença, invariavelmente resulta na morte das mudas, os prejuízos se traduzem na redução do 'stand' de mudas plantáveis, podendo causar atrasos no programa de plantio pela falta de mudas e exigir mobilização de maior área de canteiros para atender às necessidades de plantio (Ferreira, 1989; Krügener, 1980).

Presentemente, o tombamento de mudas em viveiros de eucaliptos apresenta-se sob controle razoável em razão das novas técnicas de produção de mudas e pela utilização rotineira de produtos químicos. No entanto, o uso inadequado de fungicidas sistêmicos acarreta o surgimento de linhagens de fungos resistentes aos princípios ativos de muitos fungicidas utilizados para controle.

Conforme Ferreira (1989), em termos de perspectivas futuras, a tendência é ter-se cada vez mais a queda de importância desta enfermidade nos viveiros florestais pela utilização correta das técnicas, mas na década de 60, enfatiza o autor, essa doença causou sérias preocupações às companhias florestais de Minas Gerais que plantavam eucalipto para a produção de carvão. Naquela época, a área plantada em cada companhia ficava, em alguns anos, aquém da programada, em decorrência de insuficiente quantidade de mudas para o plantio, por causa das perdas que essa doença acarretava aos viveiros (Ferreira, 1989).

O controle dessas doenças florestais em viveiros deve ser feito por meio de técnicas especiais de manejo de produção de mudas e por meios químicos. Em tais condições, não se recomenda controle por resistência de plantas, por meio de seleção de mudas resistentes à doença com base em inoculações artificiais ou surtos naturais (Ferreira, 1989). Isso porque toda a variabilidade genética da essência florestal deve ficar reservada para, eventualmente, resolverem-se os problemas de campo, como controle de doenças bióticas, controle de pragas, melhoramento que vise à produtividade e à qualidade da madeira e do produto final.

Em virtude disso, para realizar o controle dessas doenças, lança-se mão de produtos químicos sistêmicos que, muitas vezes, utilizados de forma inadequada, sem nenhum programa de controle, acarretam em resistência aos seus princípios ativos. Segundo De Waard *et al.* (1993), a eficiência do produto fica reduzida em razão do surgimento de raças resistentes do patógeno que, inicialmente, não existiam e porque, frequentemente esses produtos possuem um único sítio metabólico de atuação dentro das células fúngicas.

O objetivo deste trabalho foi averiguar o surgimento de isolados resistentes de *Botrytis cinerea*, um dos agentes causais do tombamento de mudas de *Eucalyptus* sp., aos fungicidas sistêmicos rotineiramente utilizados em viveiros florestais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os fungicidas curativos considerados sistêmicos inibem, seletivamente, processos metabólicos específicos, em grupos restritos de fungos, como a síntese dos ácidos nucleicos, de proteínas, de lipídios, de quitina, de ergosterol e na respiração celular (Costa, 1993). A alta especificidade de ação leva à alta

fungitoxidade que, aliada à absorção e à capacidade de translocação, leva ao efeito sistêmico (Bergamin Filho *et al.*, 1995).

A grande capacidade seletiva e especificidade dos fungicidas sistêmicos curativos, que lhes permite aumentar sua eficiência em relação aos fungicidas protetores e erradicantes, é, ao mesmo tempo, a causa de sua vulnerabilidade. Os fungos, por apresentarem grande maleabilidade genética, podem tornar-se resistentes a esses fungicidas de ação específica. Em condições de laboratório, podem se conseguir mutantes resistentes de todos os fungos a todos os fungicidas sistêmicos já testados (Kimati, 1995). O problema da resistência depende, em grande parte, da pressão de seleção que é exercida pelo aumento na frequência de aplicação, isto é, pela inadequada aplicação de fungicidas. Essa pressão é uma função da extensão e duração da exposição, sendo tanto maior quanto maior a área tratada com apenas um princípio ativo específico, quanto maior a dosagem e o número de aplicações (Marsha, 1977; Decker, 1985; Bergamin Filho *et al.*, 1995).

Entre os mecanismos de resistência a fungicidas, citam-se a modificação no sítio de ação (resultando em menor afinidade com o fungicida), o desvio do sítio metabólico bloqueado por uma operação ou rota alternativa e a redução da absorção (Silva *et al.*, 1999). A resistência aos benzimidazóis em fungos filamentosos, por exemplo, pode ser adquirida pela alteração estrutural da β -tubulina, componente dos microtúbulos, tendo em vista que os benzimidazóis agem diretamente sobre os microtúbulos (Davidse e Flach, 1977).

O amplo espectro de ação dos fungicidas benzimidazóis tem um valor muito grande para a Fitopatologia, porque abrange gêneros de fungos que ocasionam graves prejuízos em um grande número de importantes culturas, tais como oídios, antracnoses, sarnas, mofos cinzentos (*Botrytis* spp.) e bolores (*Penicillium* spp.) (Kimati, 1995). Seu modo de ação é a interferência na mitose dos fungos, agindo sobretudo no crescimento micelial e com pouco efeito na germinação de conídios (Davidse, 1982). Apesar dos trabalhos relatando sua eficiência (Daines e Snee, 1969), com a aplicação repetida, podem-se tornar ineficientes para controlar fitopatógenos que desenvolverem resistência a esses produtos (Fortes, 1985).

O primeiro composto desse grupo a ser desenvolvido foi o thiabendazole, introduzido, em 1961, como um vermífugo utilizado em medicina humana e veterinária. A seguir, foram introduzidos o benomil, o carbendazim e o fuberidazol. Os tiofanatos, introduzidos em 1971, são freqüentemente incluídos nesse grupo já que, sob condições naturais, são convertidos em compostos classificados como benzimidazóis (Davidse, 1982).

O grupo benzimidazol é o que possui maior número de casos assinalados na literatura de resistência em fungos, ocorrendo na Grécia, os primeiros relatos de aquisição de resistência ao benomil por raças de *Cercospora* em batata-doce e *Botrytis* em curcubitáceas (Zambolim e Chaves, 1984). A razão do grande número de fungos que adquiriram resistência aos compostos desse grupo em relação a outros ainda não está bem esclarecida. Contudo, algumas hipóteses têm sido levantadas: a) os benzimidazóis são recomendados contra grande variedade de doenças, em grande escala, possibilitando, deste modo, grandes chances para a ocorrência de resistência; b) a resistência normalmente é monogênica; c) poder de reatividade do fungicida; d) certos grupos de fungicidas sistêmicos são mais usados no tratamento de sementes o que facilita o surgimento de formas resistentes. A explicação, que muitos pesquisadores aceitam, é a alta pressão de seleção exercida por esse grupo de compostos em relação a outros. O uso contínuo de benomil no sul da Austrália, no controle da sarna da macieira (*Venturia inaequalis*) levou ao aparecimento, três anos após o início da aplicação, de raças resistentes na população desse fungo, por outro lado, raças resistentes desse fungo ao dodine, em algumas regiões do estado de Nova York, apareceram após 10 anos de uso (Zambolim e Chaves, 1984). Toledo (1974) relata que os benzimidazóis provocaram a formação de linhagens resistentes em *Botrytis cinerea* em apenas alguns meses de uso.

Uma alta persistência de linhagem resistente em relação à sensível foi observada por Miller e Jeves (1979) que relataram a ocorrência de linhagens de *Botrytis cinerea* resistente a benomil em tomateiros cultivados comercialmente em estufas, três ou mais anos após o fungicida deixar de ser utilizado.

Em viveiro de Ciclame onde havia sido usado benomil apenas três vezes (outubro de 1969, abril e junho de 1970) observou-se a ocorrência de infecções por *Botrytis cinerea*. O patógeno isolado dessas plantas mostrou-se resistente a benomil, tiofanato e furidazol, apresentando menor inibição a 1.000 ppm de benomil que a linhagem selvagem a 0,5 ppm (Bollen e Scholten, 1971).

Em um viveiro florestal de Mogi Guaçu, São Paulo, foram constatadas alta incidência e mortalidade de estacas e microestacas de *Eucalyptus* sp. causada por *Botrytis cinerea*. Apesar das freqüentes aplicações de fungicidas, incluindo benomil, iprodione, captan, metalaxyl + mancozeb e vinclozolin, cerca de 30% das estacas e microestacas amostradas exibiam sintomas e sinais da doença. Com razão da ineficácia das pulverizações de fungicidas, aventou-se a hipótese de ocorrência de linhagens do patógeno resistentes aos produtos pertencentes aos grupos benzimidazóis e dicarboximidas. Para testar tal hipótese, foi avaliada a sensibilidade de *B. cinerea* a benomil, iprodione e vinclozolin. Compararam-se o crescimento micelial e a germinação de conídios de um isolado (UFV-1) proveniente desse viveiro, com outro isolado (UFV-2), obtido de mudas de *Eucalyptus* sp., em Viçosa, Minas Gerais onde não se praticavam pulverizações de fungicidas. Iprodione e vinclozolin inibiram o crescimento micelial e a germinação de conídios de ambos os isolados testados. Todavia, benomil não foi efetivo contra o isolado UFV-1. Enquanto o isolado UFV-1 cresceu sob todas as concentrações de benomil, o isolado selvagem UFV-2 foi inibido (Alfenas *et al.*, 1999). No Brasil, linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes ao benomil também foram detectadas em outros viveiros de eucaliptos (Ghini e Krugner, 1987).

Na comparação do mecanismo de ação de vinclozolin, procimidone e iprodione em *Botrytis cinerea*, observou-se pouco efeito na germinação de conídios, mas o crescimento micelial foi afetado, sendo que, além da redução no diâmetro da colônia, ocorreu um decréscimo visível na quantidade de micélio aéreo (Pappas e Fisher, 1979). Também Fritz *et al.* (1977), estudando o mecanismo de ação de procimidone e vinclozolin em *Botrytis cinerea*, concluíram que há uma forte inibição no crescimento micelial e na germinação de conídios.

Dennis e Davis (1979) isolaram linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes à dicarboximidas, em algumas lesões com lento desenvolvimento, em morangos utilizados num experimento cuja finalidade era avaliar a eficiência dos dois fungicidas em pré e pós-colheita. Durante dois anos, constataram que a concentração que reduzia o crescimento micelial do isolado resistente em 50% (DL_{50}) variou de 160 a 480 ppm para iprodione e 150 a 650 ppm para vinclozolin, sendo que todos os isolados resistentes eram capazes de crescer em meio de BDA contendo 10.000 ppm de iprodione ou 1.000 ppm de vinclozolin. Entretanto, Hartill *et al.* (1983) constataram que aplicações freqüentes de procimidone e vinclozolin não foram eficientes no controle de *Botrytis cinerea* em folhas e frutos de tomate e pepino cultivados comercialmente em estufas. Testes de laboratório comprovaram que os isolados cresciam em meio de cultura contendo procimidone, iprodione, dichlozolate, vinclozolin, dicloran, quintozene e benzimidazóis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliação da resistência, foram utilizadas as variáveis diâmetro de colônias (cm) e percentagem de germinação de conídios (%) de dois isolados de *Botrytis cinerea*, submetidos a quatro dosagens (zero, meia dose, dose comercial e dose dupla) dos princípios ativos de três fungicidas, em quatro repetições.

Para a diluição dos produtos, utilizou-se a técnica de preparo de solução-estoque de Edington *et al.* (1971). Com base nessas soluções, foram feitas diluições em série, transferindo-se alíquotas da solução para 100ml de meio de cultura fundente, de maneira a serem obtidas as concentrações desejadas e, logo após, vertidos em placas de Petri esterilizadas.

Os isolados de *B. cinerea* foram tratados com os fungicidas benomil, procimidone e thiabendazole pela transferência de alíquotas de 2, 4, 8 ml; 2, 4, 8 ml e 4, 8, 16 ml respectivamente das soluções-estoque para meios de cultura. As alíquotas de fungicidas foram transferidas para Erlenmeyers, contendo BDA, utilizando-se micropipetas esterilizadas.

Local, data, Isolamento, identificação, cultivo e manutenção de *Botrytis cinerea*

Este trabalho constou de uma série de experimentos realizado no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, RS, no período de dezembro de 1999 a maio de 2000.

Um isolado de *B. cinerea* foi obtido de isolamentos realizados em mudas de *Eucalyptus* sp., procedentes de um viveiro florestal permanente em Guaíba, RS, (IB-1), e o outro isolado (IB-2) foi obtido junto ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais da UFSM, Santa Maria, RS, tendo sido originalmente isolado de mudas de roseiras cultivadas em estufas sem a utilização de fungicidas.

A identificação dos isolados foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da UFSM, pelas características morfológicas do fungo (Barnett e Hunter, 1984).

A manutenção dos isolados foi feita em placas de Petri com o meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA) em incubadora tipo BOD a 23°C e fotoperíodo de 12 horas, por meio de repicagens semanais sucessivas.

Efeito dos fungicidas sistêmicos no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

O efeito dos fungicidas sistêmicos benomil, procimidone e thiabendazole no crescimento micelial de *Botrytis cinerea* foi determinado pela avaliação do crescimento dos isolados fúngicos em concentrações crescentes desses produtos.

As colônias dos isolados foram cultivadas em meio de cultura BDA. Após cinco dias de incubação, discos de micélio com 0,67cm de diâmetro foram retirados da margem das colônias e transferidos para placas de Petri, contendo BDA, suplementado com as doses dos fungicidas.

A incubação se deu em câmara climática Eletrolab/BOD, a 23°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram feitas a cada 24 horas, até que a testemunha ocupasse toda a placa de Petri. Um paquímetro foi utilizado para medir o crescimento diamétrico das colônias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, trifatorial (2x3x4), isto é, dois isolados, três fungicidas sistêmicos e quatro dosagens, utilizando-se quatro repetições para cada tratamento.

Efeito dos fungicidas sistêmicos na germinação de conídios de *Botrytis cinerea*

O efeito dos fungicidas sistêmicos benomil, procimidone e thiabendazole sobre a germinação de conídios de *B. cinerea* foi determinado pela avaliação do percentual de conídios germinados e não-germinados dos isolados fúngicos em concentrações crescentes desses produtos, como descrito anteriormente.

Os isolados foram cultivados em condições favoráveis à esporulação, isto é, em elevada umidade, temperaturas de 21°C e luminosidade controlada, alternando-se períodos de 48 h de escuro por 12 h de luz (Ferreira, 1989).

As suspensões de esporos de cada isolado foram preparadas em dois béqueres com 16 ml de solução de tween 80 (0,1% de tween 80 em água destilada e esterilizada). Os esporos foram contados em Câmara de Neubauer (hemocitômetro), ajustando-se a concentração para $1,5 \times 10^6$ esporos/ml.

Após o ajuste da concentração de esporos, pipetou-se 0,5 ml da suspensão por placa com Agar-água, que foi espalhada unilateralmente, com uma alça de Drigalski esterilizada, sobre o meio solidificado contendo os tratamentos. O comportamento dos isolados foi estudado nas mesmas condições utilizadas para avaliar o crescimento micelial.

A avaliação das percentagens de germinação foi feita ao microscópio após 24 e 48 horas de incubação, examinando-se cinco áreas por placa, contando-se o número de esporos germinados e não-germinados. Utilizaram-se, para calcular a percentagem de conídios germinados, as médias das cinco áreas observadas aleatoriamente em cada placa.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, trifatorial (2x3x4), isto é, dois isolados, três fungicidas sistêmicos e quatro dosagens, utilizando-se duas repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos fungicidas no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

Conforme os resultados da análise da variância dos dados de crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, conclui-se ao nível de 5% que existe interação entre os fatores: Isolados, Fungicidas e Doses.

As comparações entre médias dos isolados do fungo (Tabela 1) mostraram que houve diferenças de médias de crescimento de colônia entre os isolados IB-1 e IB-2, indicando que os isolados são diferentes.

Nas comparações entre médias de crescimentos miceliais de *Botrytis cinerea*, quando utilizados os fungicidas benomil, procimidone e thiabendazole, observou-se ausência de diferenças entre os fungicidas procimidone e thiabendazole que são menores que a do benomil (Tabela 1).

TABELA 1: Comparação entre médias de crescimento micelial em função dos isolados e dos fungicidas (Fatores Qualitativos).

TABLE 1: Comparison between averages of micelial growth in function of the isolated ones and the fungicides (Qualitative Factors).

Fatores Qualitativos	Crescimento Micelial (Médias – cm)
IB-1	2,636 *
IB-2	1,566
Benomil	2,655 a
Procimidone	1,824 b
Thiabendazole	1,824 b

Em que: * = Significativo pelo Teste de F; Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As equações de melhor ajuste para estimar o crescimento micelial, em função das doses para cada isolado tratado com os fungicidas benomil, procimidone e thiabendazole (Tabela 2), são um instrumento útil na determinação da DL_{50} .

TABELA 2: Equações de regressão para crescimento micelial em função das doses.

TABLE 2: Equations of regression for micelial growth in function of the doses.

Fatores	Modelos e Coeficientes	R ²	R ² _{xy}	F
IB-1/benomil	CM=8,33000-18,23562dose+15,46937 dose ² -413625dose ³	0,9991	0,1053	4.367,6*
IB-1/procimidone	CM=7,64845-14,31245dose+5,30090dose ²	0,8910	0,8909	53,08*
IB-1/thiabendazole	CM=7,64845-14,31245dose+5,30090dose ²	0,8910	0,1385	53,08*
IB-2/benomil	CM=6,26425-21,92487dose+21,92487dose ² -6,26425dose ³	0,9941	0,2423	668,24*
IB-2/procimidone	CM=6,26425-21,92487dose+21,92487dose ² -6,26425dose ³	0,9941	0,2423	668,24*
IB-2/thiabendazole	CM=6,26425-21,92487dose+21,92487dose ² -6,26425dose ³	0,9941	0,2423	668,24*

Em que = * = Significativo ao nível de 5% de probabilidade; CM = Crescimento micelial (cm).

O crescimento do isolado IB-1 foi inversamente proporcional à dose de benomil (Figura A), isto é, quanto maior a dose do fungicida benomil, menor o crescimento micelial do isolado. Observou-se também que houve crescimento do isolado, indicando a resistência do isolado IB-1 ao benomil o que é contrastante com a grande sensibilidade do isolado IB-2.

A ocorrência de resistência a benomil por *Botrytis cinerea* em viveiros de eucalipto, no Brasil, já havia sido relatada anteriormente (Alfenas *et al.*, 1999; Ghini e Krugner, 1987). Isolados de *Botrytis cinerea* resistentes a benomil também já foram relatados em outras culturas, como a do tomate (Miller e Jeves, 1979) e pepino (Hartill *et al.*, 1983).

Alfenas *et al.* (1999) demonstraram que o isolado UFV-1, de *Botrytis cinerea*, era resistente a todas as concentrações de benomil testadas, enquanto o isolado selvagem UFV-2 foi inibido. Apesar do objetivo do presente trabalho não ter sido a quantificação do nível de resistência de *Botrytis cinerea* ao benomil, observou-se que o uso do dobro da dose recomendada inibiu o crescimento micelial do isolado IB-1, em contraste com o isolado UFV-1, relatado por Alfenas *et al.* (1999).

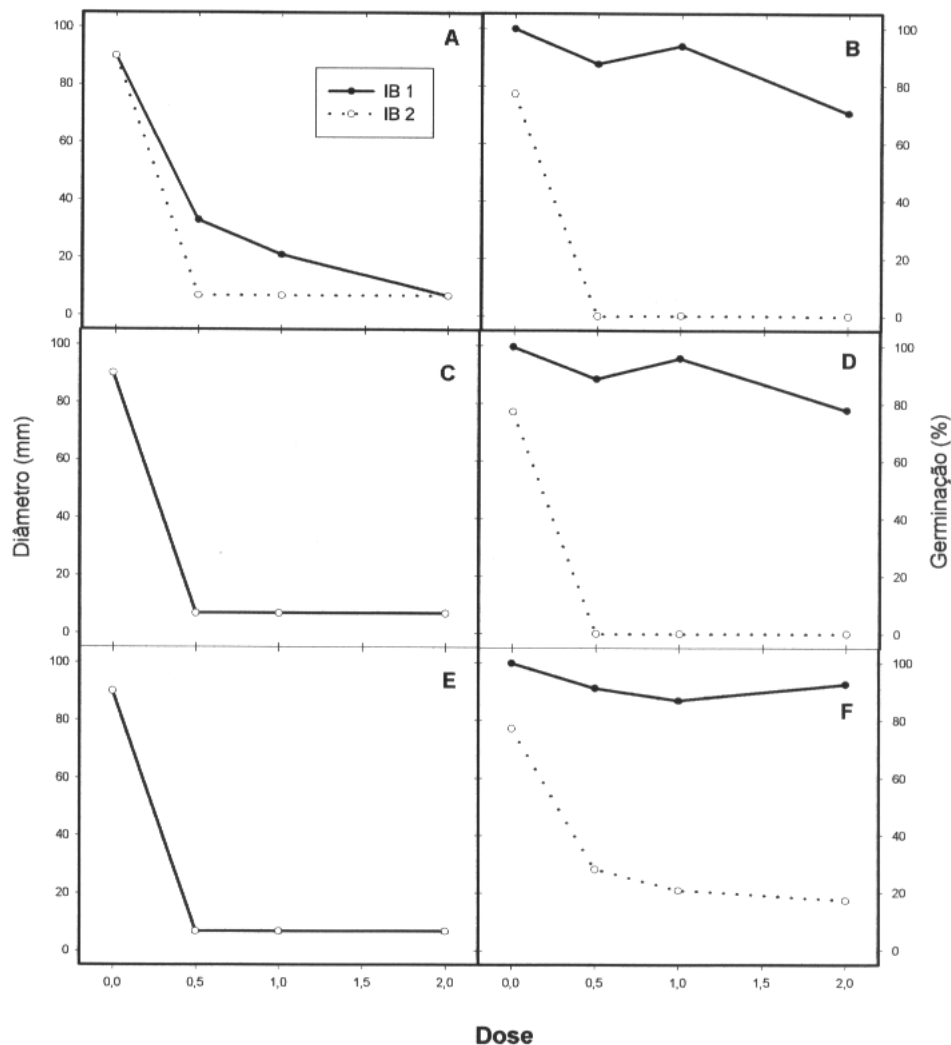


FIGURA 1: Efeito dos fungicidas benomil (A, B), procimidone (C, D) e thiabendazole (E, F) no crescimento micelial (A, C, E) e na germinação de conídios (B, D, F) de dois isolados (IB-1 e IB-2) de *Botrytis cinerea*.

FIGURE 1: Effect of the fungicides benomil (A, B), procimidone (C, D) and thiabendazole (E, F) in the micelial growth (A, C, E) and in the germination of conídios (B, D, F) of two isolated ones (IB-1 and IB-2) of *Botrytis cinerea*.

Os isolados IB-1 e IB-2 tiveram seu crescimento micelial controlado em todas as doses de procimidone, com exceção da testemunha, não apresentando resistência (Figura B). O procimidone afeta o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, podendo também reduzir a quantidade de micélio aéreo (Fritz *et al.*, 1977; Pappas e Fisher, 1979). No entanto, a resistência de *Botrytis cinerea* ao procimidone em culturas de tomate e pepino já foi relatada (Hartill *et al.*, 1983).

Os isolados IB-1 e IB-2 também tiveram seu crescimento micelial controlado em todas as doses de thiabendazole (Figura C), indicando que não há resistência a esse fungicida.

Efeito dos fungicidas sistêmicos na germinação de conídios de *Botrytis cinerea*

Conforme Análise da Variância dos dados de germinação de conídios de *Botrytis cinerea*, conclui-se que existe interação entre isolados, fungicidas e doses.

A porcentagem de germinação dos conídios dos dois isolados diferiu significativamente (Tabela 3). Também houve diferença de germinação em função dos fungicidas, com a menor porcentagem em procimidone e maior em thiabendazole.

TABELA 3: Comparação de médias de germinação de conídios em função dos isolados e fungicidas (fatores qualitativos).

TABLE 3: Comparison of averages of germination of conídios in function of isolated and the fungicidal ones (qualitative factors).

Fatores Qualitativos	Porcentagem de Germinação (Médias – %)
IB-1	68,02 *
IB-2	26,71 *
Benomil	55,89 a
Procimidone	20,41 b
Thiabendazole	65,79 c

Em que: * = Significativo pelo Teste de F; Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As equações de melhor ajuste para estimar a germinação de conídios em função das doses para cada isolado tratado com benomil, procimidone ou thiabendazole (Tabela 4), podem ser usadas para estimar também a DL_{50} .

TABELA 4: Equações de regressão para porcentagem de germinação em função das doses.

TABLE 4: Equations of regression for percentage of germination in function of the doses.

Fatores	Modelos e Coeficientes	R ²	R ² _{xy}	F
IB-1/benomil	$GC=10,00000-819583dose+12,82250dose^2-4,50166dose^3$	0,4553	0,8661	3,34*
IB-1/procimidone	$GC=10,00000-322375dose+4,94125dose^2-1,88750dose^3$	0,5459	0,7651	4,81*
IB-1/thiabendazole	$GC=9,96863-5,81136dose+0,23277dose^2$	0,2534	0,2413	2,21
IB-2/benomil	$GC=9,06500-29,57250dose+30,06750dose^2-8,68500dose^3$	0,9979	0,1888	1932,17*
IB-2/procimidone	$GC=9,06500-29,57250dose+29,24250dose^2-8,35500dose^3$	0,9995	0,0918	8.269,2*
IB-2/thiabendazole	$GC=9,06500-11,66500dose+9,92500dose^2-2,69000dose^3$	0,9499	0,4680	95,77*

Em que: * = Significativo ao nível de 5% de probabilidade; GC = Porcentagem de germinação de conídios (%).

Nenhuma das doses de benomil inibiu a germinação de conídios do isolado IB-1 o que é contrastado pela alta sensibilidade do isolado IB-2 que foi controlado com metade da dose, indicando a resistência do primeiro (Figura B), como também observado para o crescimento micelial.

Apesar da melhor dose de procimidone para controlar a germinação de conídios do isolado IB-1 ter sido a dose dupla, nenhuma foi eficiente (Figura D), concordando com os estudos de Pappas e Fisher (1979), sobre o mecanismo de ação de procimidone em *Botrytis cinerea* que demonstraram pouco efeito desse fungicida na germinação de conídios, mas por outro lado, discorda de Fritz *et al.* (1977) que também estudaram o mecanismo de ação de procimidone em *Botrytis cinerea* e concluíram que há uma forte inibição da germinação de conídios. Em contraste, o isolado IB-2 foi sensível a todas as doses do fungicida procimidone (Figura D) e metade da dose recomendada foi suficiente para controlar a germinação dos conídios, concordando com Fritz *et al.* (1977). É possível que o efeito de inibição da germinação de conídios seja também função de isolado, havendo aqueles mais ou menos sensíveis. Nesse caso, o isolado IB-1 foi menos sensível.

Nenhuma das doses testadas do fungicida thiabendazole foi eficiente para controlar a germinação de conídios dos isolados IB-1 e IB-2 (Figura F).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que: O isolado de *Botrytis cinerea* IB-1 apresenta resistência ao fungicida benomil pertencente ao grupo dos benzimidazóis, e não apresenta resistência aos fungicidas procimidone e thiabendazole pertencentes aos grupos dos benzimidazóis e dicarboximidazóis, respectivamente.

Além disso, nenhum dos fungicidas testados (benomil, procimidone e thiabendazol) foram eficientes na inibição da germinação dos conídios dos isolado IB-1 de *Botrytis cinerea*, em nenhuma das doses testadas. Outros fungicidas deverão ser avaliados para evitar a infecção primária nos viveiros onde o isado IB-1 foi obtido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; SANFUENTES, E.; TEIXERA, A. D.; MILANI, D. Mofocinzeno, causado por *Botrytis cinerea* (Persoon ex Fries) em estacas e microestacas de *Eucalyptus* sp., resistência a benomil e erradicação de inóculo do patógeno com água quente. **Revista Árvore**, Viçosa. v. 4, n.23, p. 497-500, 1999.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, H. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1984. 241p.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 2.
- BOLLEN, G. J.; SCHOLTEN, G. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. **Neth. J. Plant Patol**, n. 77, p. 83-90, 1971.
- COSTA, I. F. D. **Fitopatologia geral**. Cruz Alta: Fund. Univ. Cruz Alta. 1993. 79 p. Apostila de aulas teóricas.
- DAVIDSE, L. C. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G. **Fungicide resistance in crop protection**. Wageningen: Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p. 60-70.
- DAVIDSE, L. C.; FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol -2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Cell Biology**, New York, n. 72. p.93-174, 1977.
- DECKER, J. Strategies for avoiding resistance to fungicides. In: JENKYN, J.E. ; PLUMB, R.T. **Strategies for the Control of Cereal Disease**. Oxford: Blackwell, 1985. p.123-133.
- DENNIS, C.; DAVIS, R. P. Tolerance of *Botrytis cinerea* to iprodione and vinclozolin. **Plant Pathology**, n. 28, p. 3-131, 1979.
- DE WAARD, M. A.; GEORGOPOULOS, S. G.; HOLLOWAY, D. W. Chemical control of plant disease: problems and prospects. **Annual Review of Phytopathology**, n. 31, p. 21, 1993.
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal, principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Ed. Folha de Viçosa, 1989. 571p.
- FIGLIOLIA, M. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. **Manejo de sementes de espécies arbóreas**. São Paulo: Instituto Florestal, 1995. p. 1-56.
- FORTES, J. F. *Glomerella cingulata* e *Penicillium* sp: surgimento de cepas resistentes ao benomyl. **Fitopatologia Brasileira**, n. 10, p. 280, 1985.
- FRITZ, R.; LEROUX, R.; GRETT, M. Mécanisme de l'action fongitoxique de la promidone (26019 RP ou glycofène), de la vinchlozoline et du dicloran sur *Botrytis cinerea* Pers. Berlin. **Phytopathologische Zeitschrift**, n. 90, p. 63-152, 1977.
- GHINI, R.; KRUGNER, T. L. Ocorrência de *Botrytis cinerea* resistente a benomil em viveiro de *Eucalyptus viminalis*, em Três Barras, SC. **Summa Phytopathologica**. v. 13., n. 1-2, p. 37, 1987.
- HARTILL, W. F. T.; TOMPKINS, G. R.; KLEINSMAM, P. J. Development in New Zealand of resistance to dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*, to acylalalinines in *Phytophthora infestans*, and to guazatine in *Penicillium italicum*. Wellington. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, n. 26, p.191-261, 1983.
- KIMATI, H. Controle químico. In: **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 38, p. 761-785.
- KRUGNER, T. L. Doenças do eucalipto. In: **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2. cap. 18. p. 275-282.
- MARSHA, R. W. **Systemic fungicides**. 2nd ed. London: Longman, 1977.401p.
- MILLER, M. W.; JEVES, T. M. The persistence of benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* in glasshouse tomato crops. **Plant Pathology**, Oxford, n. 28, p. 119-141, 1979.

PAPPAS, A. C.; FISHER, D. J. A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. **Pesticide Science**, n.10, p. 239-246, 1979.

SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R. A.; MELO, I. S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma spp.* a benomil e iprodione. **Revista Científica do Centro de Ciências Rurais**, v. 3, n. 29, p. 395-399, 1999.

TOLEDO, A. C. D. Resistência a fungicidas. **O Biológico**, n. 40, p. 162-170, 1974.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. **Defensivos agrícolas**: fungicidas, compostos sistêmicos recomendados para controle de doenças. Viçosa: MEC/CAPES/ABEAS, 1984. Módulo 3, 333 p.