



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE
Botrytis cinerea A FUNGICIDAS**

MAURO KOOZO KIMURA

1999

MAURO KOOZO KIMURA

**SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE
Botrytis cinerea A FUNGICIDAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Kimura, Mauro Koozo

Sensibilidade e resistência *In vitro* de *Botrytis cinera* a fungicidas / Mauro
Koozo Kimura. -- Lavras : UFLA, 1999.

132 p. : il.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Fungicida. 2. Sensibilidade. 3. Resistência. 4. Adaptabilidade. 5. *Botrytis
cinerea*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-632.4

MAURO KOOZO KIMURA

**SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE
Botrytis cinerea A FUNGICIDAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA EM 21 DE AGOSTO DE 1999

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela Resende UFLA

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA

Prof. Dr. Leonardo Gianasi EPAMIG



Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza

UFLA

(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICO

À glória de DEUS

Pelo destino,

Pela saúde e paz.

Aos meus pais, Kenkiti e Tereza, pelo dedicação do ensino.

Aos irmãos Ivete, Edson, Márcio, Irene e Emerson.

**À minha esposa Roselane e ao meus filhos Kevin e Amanda, e aos sogros
Raimundo e Maria.**

SEMPRE GRATO.

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, pela diversidade do ensino.

À instituição de apoio ao ensino e pesquisa, CAPES, pela bolsa de estudo.

Às empresas colaboradora, CHAMPIOM - Papel e Celulose Ltda e CHAMFLORA, pela ajuda e oportunidade de desenvolver a pesquisa; às empresas de defensivos agrícolas CYANAMID, BAYER, NOVARTIS, DU PONT, ZENECA e HOKKO, pela doação de amostras de fungicidas.

Aos Profs. Paulo Estevão de Souza e Hilário Antônio de Castro, pela longa convivência e orientação em diversos trabalhos.

Aos Profs. Paulo Estevão de Souza, Ricardo Magela de Souza, Mário Sobral de Abreu, Leonardo Gianasi e Mário Lúcio Vilela Resende, membros da banca examinadora, pela indispensável colaboração.

Ao Prof. Júlio Bueno do Departamento de Ciências Exatas, pela grande colaboração nas análises estatísticas.

Aos demais Profs. do Departamento de Fitopatologia pela convivência.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia pela amizade.

Em especial, agradecimento aos funcionários Agenor (*in memória*), Psida (ex-funcionária), Elô, Ana e ao Marco.

Aos amigos de curso pela amizade e companheirismo.

Em especial aos amigos Wirton e Flávio, pelas grandes vitórias alcançadas.

Aos vizinhos do bairro pelo incentivo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1 - Sensibilidade e resistência <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> a fungicidas	
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	03
2.1 Aspectos gerais de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr.	03
2.2 Taxonomia de <i>Botrytis cinerea</i>	04
2.3 Controle químico de <i>Botrytis cinerea</i>	05
2.4 Resistência a fungicidas.....	08
3 Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2 - Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> a fungicidas.	
1 Resumo.....	30
2 Abstract.....	32
3 Introdução.....	34
4 Material e Métodos.....	36
4.1 Obtenção do isolado de <i>Botrytis cinerea</i>	36
4.2 Sensibilidade micelial de <i>Botrytis cinerea</i> a fungicidas.....	37
4.3 Sensibilidade micelial de <i>Botrytis cinerea</i> a misturas de fungicidas.....	40
4.4 Inibição da germinação.....	41
4.5 Erradicação de micélio de <i>Botrytis cinerea</i>	42
4.6 Erradicação de escleródios de <i>Botrytis cinerea</i>	43
4.7 Frequência de conídios resistentes a fungicidas.....	44
5 Resultados e Discussão.....	46

6 Conclusões.....	67
7 Referências Bibliográficas.....	68
CAPÍTULO 3 - Adaptabilidade <i>in vitro</i> de linhagens de <i>Botrytis cinerea</i> resistentes a fungicidas.	
1 Resumo.....	71
2 Abstract.....	73
3 Introdução.....	75
4 Material e Métodos.....	78
4.1 Obtenção <i>in vitro</i> de linhagens resistentes a fungicidas.....	78
4.2 Crescimento micelial das linhagens.....	79
4.3 Esporulação das linhagens.....	79
4.4 Capacidade de germinação das linhagens.....	80
4.5 Estabilidade da resistência das linhagens em meio BDA.....	81
4.6 Patogenicidade das linhagens.....	81
4.7 Estabilidade da resistência das linhagens em meio com fungicidas.....	82
4.8 Resistência cruzada e a dupla resistência das linhagens obtidas, aos fungicidas benomyl e iprodione.....	83
5 Resultados e Discussão.....	85
6 Conclusões.....	107
7 Referências Bibliográficas.....	108
ANEXOS.....	111

CAPÍTULO 1

SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE *Botrytis cinerea* A FUNGICIDAS

RESUMO

KIMURA, Mauro Koozo. Sensibilidade e resistência *in vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas. Lavras: UFLA, 132p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

A cultura do eucalipto é considerada de grande importância agrícola, devido a grande extensão em área plantada. Dentre alguns problemas da cultura destaca-se, as perdas ocasionada por fungos na fase de formação das mudas. A intensiva produção de mudas em viveiros florestais, propicia um ambiente favorável a ocorrência de doenças, destacando a doença conhecida como mofo cinzento ou tombamento de estacas ocasionada pelo fungo *Botrytis cinerea*. Para o controle deste patógeno, diversas medidas de manejo da doença podem ser adotadas, mas devido a necessidade da grande produção de mudas, táticas de controle químico são adotadas indiscriminadamente, pois há poucos estudos sobre a recomendação de fungicidas e sua estratégia de aplicação do controle do mofo cinzento do eucalipto. O uso de forma inadequada destes fungicidas ocasiona diversos problemas, sendo um deles relacionado a resistência de fungos a fungicidas, problemas advindos da má aplicação em altas concentrações e em épocas inadequadas. A ocorrência de fungos resistentes pode ocasionar grandes

Comitê Orientador: Paulo Estevão de Souza - UFLA (Orientador), Mário Lúcio Vilela Resende - UFLA, Mário Sobral de Abreu - UFLA, Ricardo Magela de Souza - UFLA

perdas na cultura e para a empresa fabricante do produto químico, entretanto, isto ocorre quando o fungo se adapta as condições locais competindo com os fungos sensíveis e mantendo-se patogênicos, com a mesma capacidade de sobrevivência e disseminação. Em diversos países da América, Europa e Ásia várias publicações tem relatada a resistência de fungos a fungicidas como para o benomyl, iprodione, dichlofluanid, procymidone, metalaxyl e para alguns fungicidas DMI's (inibidores de reação de demetilação) como os triazóis, imidazoles e pirimidinas. Diversos pesquisadores realizaram testes *in vitro*, utilizando o método de fungicida incorporado ao meio de cultura BDA, para avaliar a sensibilidade micelial ao fungicida, a sensibilidade de conídios em solução fungicida, testes *in vivo* para avaliar a patogenicidade e capacidade competitiva das linhagens; e para a adaptabilidade do fungo ao fungicida, teste sobre a estabilidade da resistência são feitas no meio de cultura com e/ou sem fungicida. Pela falta de estudos, necessitam-se de estudos relacionados às estratégias de controle do mofo cinzento e sensibilidade de *B. cinerea* a fungicidas, e também da adaptabilidade de linhagens resistentes a fungicidas.

ABSTRATC

KIMURA, Mauro Koozo. In vitro sensitivity and resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides. Lavras: UFLA, 1999. 132p. (Dissertation - Magister Science in Phytopathology)

Eucalyptus cultivation is considered of great agricultural importance, due to the large extension in planted area. Of the problems of the culture, the losses brought about by fungi at the phase of cutting formation stand out. The intensive production of cuttings in forest nurseries, enables an environment favorable to the occurrence of diseases, standing out the disease known gray mold or damping-off, provoked by the fungus *Botrytis cinerea*. For the control of this pathogen, a number of measures of management of the disease can be adopted, but due to the need of the great production of cuttings, chemical control tactics are adopted indiscriminately for there are few studies on fungicide recommendation and its application strategy of the control of eucalyptus gray mold. Use in an inadequate way of those fungicides brings a lot of problems, one of them being related to the resistance of fungi to fungicides, problems stemming from misapplication at high doses and in inadequate times. Occurrence of resistant fungi can give rise to large losses in the crop and to the enterprise manufacturing the chemical, however, this takes place when the fungus becomes adapted to the local conditions, competing with sensitive fungi and keeping themselves pathogenic, with the same capacity of survival and dissemination. In several countries of the Americas, Europe and

Guidance Committee: Paulo Estevão de Souza - UFLA (Adviser), Mário Lúcio Vilela Resende - UFLA, Mário Sobral de Abreu - UFLA, Ricardo Magela de Souza - UFLA.

Asia, a number of issues has reported the fungal resistance to fungicides, such as benomyl, iprodione, dichlofluanid, procymidone, metalaxyl and to some DMI's (demethylation reaction inhibitors) as triazols, imidazols and pirimidines. Several research works utilize *in vitro* tests as the method of fungicide incorporated to the of culture medium PDA to evaluate the mycelial sensitivity to the fungicide, the sensitivity of spores in fungicide solution, *in vivo* tests to evaluate the pathogenicity and competitive capacity of the strains; and for the adaptability of the fungus to the fungicide, test about the resistance stability are done in the culture medium with and/or without a fungicide. Further studies related to the control strategies of gray mold and the sensitivity of *B. cinerea* to fungicides, and also of the adaptability of fungicide resistant strains are needed.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a cultura do gênero *Eucalyptus* apresenta-se como a 3ª maior cultura em área cultivada no Brasil, apresentando 7 milhões de hectares no ano de 1994, superada apenas pelas culturas do milho e da soja (FAO, 1992). A participação dos produtos florestais nas exportações brasileiras chegou a 5,2% em 1992, mantendo uma participação de 2 a 7% no PIB nacional nos últimos 20 anos. O setor florestal cria, diretamente, em torno de 600 mil empregos, e indiretamente, 1 milhão (Anuário ..., 1993 e Associação ..., 1993).

A produção de mudas das espécies florestais, sobretudo a de eucalipto, é realizada por empresas florestais, utilizando tecnologia de produção intensiva de mudas, por meio de estaquia, microestaquia, micropropagação e semente.

A tecnologia que tem colocado as empresas florestais em destaque em termos de produção de mudas de eucalipto tem trazido dificuldades, especialmente no que se refere à incidência e severidade de doenças fúngicas. Dentre as muitas doenças fúngicas no viveiro florestal de eucalipto, destacam-se o mofo cinzento e o tombamento de mudas, causado por *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr (Ferreira, 1989 e Ferreira, 1997).

O fungo *B. cinerea* é um parasita facultativo, que encontra-se distribuído em todo mundo, principalmente em cultivos dentro de casas-de-vegetação e em cultivos intensivos, ocasionando grandes perdas quando não controlado ou quando torna-se resistente aos fungicidas.

O ambiente com elevada umidade e temperaturas amenas é extremamente favorável para o desenvolvimento do patógeno, que nestas condições é favorecido em termos de sobrevivência, de adaptação, de disseminação e de infecção.

Com a implantação de maciços homogêneos, o risco da ocorrência de doenças em níveis epidêmicos é grande, com isso, há necessidade de se adotar medidas de controle. Atualmente, uma das medidas mais utilizadas é o controle químico, que quando utilizado de maneira correta, com um acompanhamento especializado, é capaz de controlar eficientemente as doenças mais importantes que possam ocorrer principalmente em viveiros florestais. Uma das principais preocupações quanto ao uso indiscriminado de fungicidas é a possibilidade de adaptação dos fungos, criando resistência (Kimati, 1987).

Muitos trabalhos têm demonstrado a existência de isolados de *B. cinerea* resistente a fungicidas, obtidos de cultivos comerciais, em diferentes culturas. Tem-se encontrado linhagens de *B. cinerea* resistentes, principalmente aos grupos químicos benzimidazóis (Smith, 1994) e dicarboximidas (Lorenz, 1994), podendo, em alguns casos, esta resistência ser, para ambos grupos químicos, chamadas de resistência cruzada (Northover e Matteoni, 1986; Kimati, 1995 e Raposo, 1996).

No cultivo de mudas de eucalipto, não há fungicidas especificamente recomendados para o controle de *B. cinerea*. É necessário testar novas moléculas para que haja alternativas do controle, através da integração de vários métodos, reduzindo o surgimento de resistência a fungicidas nas populações do patógeno.

O presente trabalho objetivou avaliar a sensibilidade de *B. cinerea* a fungicidas e a adaptabilidade de linhagens resistentes a fungicida, *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.

O fungo *B. cinerea* é um parasita facultativo, cosmopolita, causando danos principalmente em casas-de-vegetação e em plantas ornamentais, horticolas, frutíferas (Agrios, 1997, Krugner e Bacchi, 1995) e também em mudas de eucalipto (Ferreira, 1989). É o agente causal de doenças conhecidas como mofo cinzento, queima de botrytis e tombamento de mudas, atacando folhas, hastes e frutos. É considerada como uma das doenças mais comuns em cultivos protegidos.

São sintomas comuns causados por *B. cinerea*: manchas foliares, podridões da coroa e da copa, cancro das hastes, podridões de mudas, tombamentos, podridões de armazenamento de raízes, de rizomas e de frutos. Os tecidos feridos ou senescentes são especialmente susceptíveis à invasão pelo fungo. Lesões causadas por *B. cinerea* são facilmente identificadas, no campo, pelas suas características de esporulação e do mofo penugento (Ferreira, 1989; Daughtrey, Wick e Peterson, 1995).

No tombamento de mudas de eucalipto, praticamente vêem-se infecções de *B. cinerea* com mais intensidade no estágio de fechamento de canteiros, sendo o patógeno que predomina nesse estágio. Provavelmente, o que acontece é que a partir de outras fontes de inóculo e com o auxílio de ventos, os conídios são disseminados e chegam até às copas das mudas nesse estágio. Em seguida, lavados pela irrigação ou pela chuva, caem sobre folhas mortas, na superfície dos recipientes, sob a copa entrelaçada das mudas, onde se verifica a sua colonização saprofítica, seguindo-se intensa produção de estruturas reprodutivas do fungo na superfície desse substrato.

A presença de esporulação do fungo é visualizada sobre folhas mortas na superfície dos recipientes, como mofo marrom-acinzentado ou prateado. As primeiras infecções de hastes das mudas ocorrem quando o fungo entra em contato com o limbo senescentes, ocorrendo a colonização e esporulação. A elevada umidade e temperaturas relativamente baixas ou moderadas (dias garoentos) são condições favoráveis para infecção e esporulação de *B. cinerea*. Os conídios podem ser disseminados facilmente pelo impacto de gota de água de irrigação ou de chuva na esporulação, que normalmente é abundante e seca. Saprofiticamente, o fungo vive em folhas e em outros órgãos vegetais mortos no solo, especialmente de seus hospedeiros. Sobre e nos tecidos desses materiais, o fungo produz hifas e escleródios. Os escleródios podem garantir-lhe sobrevivência em condições de ambiente desfavoráveis, fatais para as hifas normais. Em condições de temperatura e umidade favoráveis, os escleródios germinam produzindo hifas com poder para colonizar tecidos vegetais vivos ou mortos e produtoras de conidióforos e conídios. (Ferreira, 1989; Krugner e Auer, 1997).

2.2 Taxonomia de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers. ex Fr é um fungo mitospórico, sendo anamorfo do filo ascomicota, da ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae, do gênero *Botryotinia* (Alexopoulos, Mims e Blackwell, 1995 e Hawksworth et al., 1995). O anamorfo produz micélio abundante, de coloração pardo acinzentada, com conidióforos longos, septados, com ramificações dicotômicas e denticulos sustentadores dos conídios. Células conidiogêneas terminais apresentam-se nas extremidades das ramificações, com conídios unicelulares nas dimensões de 4-11 µm x 6-18 µm, em que são multinucleados (3 a 18 núcleos, média de 5), hialinos ou quase hialinos; lisos e globosos encontram-se ligados. A produção de conídios é abundante, tanto em meios de cultura como em tecidos de hospedeiros

infectados. Formam escleródios bem desenvolvidos, com variação de tamanho desde poucos milímetros até mais de 1 cm, de coloração negra tanto em meio de cultura com em restos culturais, que determinam a sobrevivência do patógeno em condições adversas (Agrios, 1997; Krugner e Bacchi, 1995; Ferreira, 1989 e Jarvis, 1980).

2.3 Controle químico de *Botrytis cinerea*

Atualmente, não existem fungicidas registrado no Ministério da Agricultura para o controle de tombamento de mudas ou mofo cinzento, causados por *B. cinerea* na cultura do eucalipto (Compêndio, 1999). Utilizam-se, portanto, as recomendações definidas para outras culturas. Entretanto, o uso desordenado e sem acompanhamento técnico correto aumenta o risco de usar uma super ou subdosagem necessária, bem como intervalos de aplicações muito próximas ou distantes, possibilitando ao fungo selecionar e/ou adquirir resistência em relação ao produto aplicado inadequadamente. Para controle, pulverizações são realizadas em intervalos de 2-3 dias entre as aplicações.

De acordo com Ferreira (1989), o controle químico seria recomendável somente após a constatação da doença em viveiros de grandes dimensões quando o manejo da doença não poderia ser realizado em curto período (3 ou 4 dias) ou quando chuvas ocorressem nos dias subsequentes à realização das práticas de manejo. Neste caso, o controle químico dar-se-ia somente durante as próximas duas semanas, realizado-se de uma a duas pulverizações semanais, alternadas com as misturas de 35 g de benomyl + 150 g de thiran/100 L e 35 g de benomyl + 100 g de captan/100 L. Ferreira (1997) também recomenda utilizar 120 g de captan, ou 120 g de chlorotalonil ou 120 g de dicloran/100 L de água, em duas pulverizações semanais, após realizar o rouging. Krugner e Bacchi (1995) recomenda pulverizações de thiran, maneb, captan, acetato de trifênil estanho,

iprodione ou vinclozolin. O uso de benomyl somente poderá ser feito juntamente com algum dos princípios ativos citados, pela existência de isolados já resistente ao mesmo. Daughtrey, Wick e Peterson (1995) recomenda os fungicidas chlorotalonil, hidróxido de cobre e mancozeb, usados em misturas de tanque fungicidas convencionais e sistêmicos, em dosagens reduzidas, no controle de *B. cinerea*. Souza (1991), pulverizando mudas de eucalipto com os fungicidas benomyl (35 e 70 g), captan (150 e 300 g) e thiran (210 e 420 g do P.C./100l) e inoculadas com *B. cinerea* após três dias da pulverização, obteve grande variação de controle do mofo cinzento do eucalipto.

Para o controle do mofo cinzento do morangueiro (Elad et al., 1995) relatam uma utilização extensiva de fungicidas para o controle desta doença, destacando-se dois grupos de fungicidas, como os benzimidazóis e os dicarboximidas, que inicialmente possuíam alta eficiência contra *B. cinerea*. Com a entrada dos fungicidas dicarboximidas, em 1977 passou-se a controlar esta doença onde havia predominância de populações do patógeno resistente aos benzimidazóis (Panayotakou e Malathrakis, 1983). Por vários anos, o controle químico de doenças causada por *B. cinerea* foi dependente destes fungicidas, principalmente o iprodione e vinclozolin (Locke e Fletcher, 1988), mas devido à sua grande e indevida utilização, surgiram populações resistentes do patógeno a esses produtos (Vali e Moorman, 1992; Northover e Matteoni, 1986 e Katan, 1982). Lorbeer e Vincelli (1990) obtiveram vários graus de controle da queima das folhas de cebola utilizando os fungicidas dicarboximidas sozinhos ou em mistura. Quando aplicado sozinho, iprodione foi melhor que vinclozolin. Entretanto, usando dicarboximidas misturados com chlorotalonil, o controle foi melhor que chlorotalonil, iprodione e vinclozolin aplicado sozinho. O fungicida chlorotalonil teve melhor desempenho do que mancozeb ou maneb+zinco quando aplicados em mistura com os dicarboximidas.

Souza (1991), realizando ensaio *in vitro* com *B. cinerea* provenientes do eucalipto, constatou que disco micelial do fungo, tratadas por 2 minutos em solução de fungicida, foram erradicados por benomyl (35 ppm), procymidone (200 ppm), captan (15 ppm) e thiran (210 ppm). Para o tratamento de escleródios por fungicidas, somente nas maiores concentrações de benomyl (350 ppm), captan (1500 ppm), e procymidone (2000 ppm) foram efetivas em 2 minutos de tratamento, e thiran não erradicou os escleródios. Já para erradicação de conídios, houve grande variação tanto no tempo de tratamento quanto na concentração dos fungicidas.

Os testes *in vitro* realizados com incorporação de fungicidas para avaliar a sensibilidade de *B. cinerea* da roseira demonstraram que: os fungicidas vinclozolin, dicloran, propiconazole, folpet, dichlofluanid e tebuconazole inibiram completamente o crescimento micelial, e chlorotalonil e thiabendazole inibiram parcialmente. Para o teste de inibição da germinação, os fungicidas mancozeb, dichlofluanid, folpet, dicloran, vinclozolin e chlorotalonil inibiram a germinação, e tebuconazole obteve 25% de germinação e thiabendazole e propiconazole não tiveram efeito. Em condições ambientais controladas, os fungicidas folpet, vinclozolin, dichlofluanid e mancozeb foram eficientes no controle do mofo cinzento em botões florais de rosa após a inoculação artificial, e os fungicidas benomyl, propiconazole e dicloran não controlaram; entretanto, em ensaio na casa-de-vegetação não houve diferença na incidência da doença (Monteiro, 1996).

Visando a capacidade de fungicidas de inibir o crescimento micelial de *Botrytis* sp., causador do mofo cinzento de estacas e micro estacas de eucalipto, Yamashita et al. (1997) destacaram os melhores fungicidas, como tebuconazole, tolilfluanid e triadimenol, nas dosagens de 10, 100 e 1000 ppm do ingrediente ativo, inibindo totalmente o fungo. Porém, fungicidas como triadimefon, folpet, cymoxamil, chlorotalonil, thiran e captan a 1000 ppm inibiram o fungo; e

iprodone, enxofre, tiofanato metílico, procymidone, oxycarboxin, quintozene, imibenconazole, fosetyl-al, tiofanato metílico + chlorotalonil, benomyl e thiabendazole foram ineficientes mesmo em concentração de 1000 ppm.

Com essa variabilidade de produtos, com relação à eficiência em testes “*in vitro*”, (Elad et al., 1995) relatam a importância na adoção de estratégia de controle da doença, em combinações ou em rotação com outros fungicidas, o que pode auxiliar na redução do surgimento de populações resistentes.

2.4 Resistência a fungicidas

A partir de 1960, foram constatadas resistência de fungos a fungicidas. Paralelamente, esta época coincide com a introdução de novos compostos que agem em sítios específicos (fungicidas sistêmicos) do patógeno, visando ao tratamento curativo e erradicante de doenças de plantas (Kimati, 1987 e Eckert, 1994).

Segundo Köller e Scheinpflug (1987), os fungicidas convencionais que interferem em vários sítios metabólicos do patógeno. precisam de várias modificações no seu genoma para desencadear o processo de resistência. Por outro lado, fungicidas inibidores de sítios específicos, ou seja, os fungicidas sistêmicos, têm um alto grau de especificidade bioquímica e inibem somente um ou poucos sítios específicos no patógeno, sendo, então, mais comum o aparecimento de resistência devido à mutação em apenas um gene ser suficiente para diminuir a afinidade com o fungicida.

Após o lançamento do benomyl, em 1969, foram desenvolvidos vários outros fungicidas sistêmicos, entre 1970 e 1980, como os grupos químicos: fenilamidas, dicarboximidas e inibidores da síntese de esterol (triazóis, imidazóis, pirimidinas, etc); por isso, a partir de 1980, vários casos de resistência de fungos a fungicidas foram registrados em várias culturas (Eckert, 1994).

De acordo com Delp e Dekker (1985), citados por Köller e Scheinpflug (1987), resistência deve ser usada apenas para definir o ajuste estável e hereditário pelo fungo ao fungicida, resultado da redução da sensibilidade ao fungicida. A diferença na sensibilidade pode ser definida pelo fator de resistência, expressa como a taxa de ED₅₀ (taxa suficiente para inibir 50% do crescimento micelial).

O surgimento da resistência está condicionado por fatores inerentes, como: maiores taxas e ciclo de reprodução e infecção do fungo e de variabilidade genética conferem ao fungo maiores chances de adaptação a um novo fungicida. Quanto mais específica a afinidade fungicida e fungo (modo de ação), maior a probabilidade de resistência, visto que a alteração de apenas um gene pode tornar o fungo insensível ao produto químico. A ocorrência de mutantes resistentes é proporcional à frequência de uso do produto fungicida, o que é consequência da pressão de seleção exercida pelo fungicida. (Gilpatrick, 1983; Köller e Scheinpflug, 1987 e Georgopoulos, 1994).

Estima-se que células fúngicas mutantes, espontâneas ou induzidas, resistentes a fungicidas sistêmico, surgem numa proporção de 1 em 10⁴ a 1 em 10⁹. Ainda que, em condições de laboratório, consigam-se mutantes resistentes de todos os fungos a todos os fungicidas sistêmicos testados, são necessários mais dois fatores para que o problema tenha repercussão no campo: a adaptabilidade do mutante e a pressão de seleção (Kimati, 1995). O decréscimo de sensibilidade pode ser causado por alterações genéticas, fisiológicas ou adaptação da célula do fungo. As alterações não genéticas podem ser instáveis e desaparecer na ausência do produto (Dekker, 1976 e Dekker, 1977).

Segundo Dekker (1982), a adaptabilidade, isto é, a virulência e ou habilidade competitiva destas linhagens, é um fator importante no estabelecimento das mesmas. Se a mutação para resistência ou adaptação ao produto afetar

negativamente a sua adaptabilidade, dificilmente esta nova população poderá ser dominante. Caso contrário, o fungicida seletivamente reduzirá ou eliminará a linhagem sensível e a população poderá sobreviver e disseminar.

Para Wade (1982), a taxa de sobrevivência e a disseminação das linhagens resistentes dependem: a) do grau de resistência adquirido pelos mutantes; b) do número de esporos resistentes dentro da população selvagem; c) da quantidade de inóculo que sobreviveu para a próxima estação; d) do tipo de doença; e) da intensidade do uso do fungicida. A intensidade do uso de fungicida é uma função composta por cinco fatores: a dose aplicada, o número de aplicação por estação, a área tratada, a eficiência da aplicação e a persistência do químico.

Alguns parâmetros estudados em laboratório e casas-de-vegetação, tais como, adaptabilidade de linhagens resistentes, podem fornecer subsídios para a previsão de prováveis conseqüências que poderão advir da expansão da população resistente no campo (Georgopoulos, 1977).

A emergência de linhagens resistentes, *in vitro*, não é um indicativo seguro de que este produto possa falhar no controle da doença no campo. O surgimento de linhagens resistentes, no campo, depende de vários fatores: da probabilidade de infecção, da velocidade de colonização do tecido hospedeiro e do grau de esporulação do mutante, os quais dependerão do nível de adaptabilidade das linhagens resistentes (Dekker, 1982).

A baixa adaptabilidade tem sido observada pelo decréscimo da taxa de crescimento, da esporulação e da virulência em relação à linhagem selvagem (Beever, Laracy e Pak, 1989). Além disto, a competição entre estas linhagens pelo espaço e por nutrientes pode ser outro fator importante no estabelecimento das linhagens resistente no campo.

Uma alta adaptabilidade dos mutantes não significa, obrigatoriamente, problema de resistência no campo nem uma baixa adaptabilidade significa

ausência de riscos de resistência. Mesmo um fungicida pouco vulnerável estará, sob condições de alta pressão de seleção, correndo riscos de aumentar as chances de mutações que originam tipos cada vez mais adaptados de mutantes resistente. Assim, o surgimento de problemas de resistência a fungicidas no campo depende, em grande parte, da pressão de seleção exercida pela inadequada aplicação de fungicidas.

De acordo com Davidse (1994), o desenvolvimento de resistência a benomyl e outros benzimidazóis tem sido relatada para um grande número de patógenos, em condições de laboratório ou de campo. Para Delp (1980), problemas de resistência aos benzimidazóis surgiram devido à utilização extensiva e intensiva do fungicida, e por ser também inibidor de um sítio específico do metabolismo do fungo, agindo na inibição da mitose (tubulina).

Quando problemas com resistência ocorrem, as linhagens resistentes a um benzimidazol são resistentes aos outros do mesmo grupo, isto é, apresentam resistência cruzada. Os fungicidas do mesmo grupo químico apresentam modos de ação semelhantes, sendo necessário, para o fungo, a mutação de apenas um gene ser suficiente para adquirir resistência cruzada aos fungicidas do mesmo grupo químico (Miller e Fletcher, 1974; Miller e Jevés, 1979 e Lorenz, 1994).

Lorenz (1994) relata que isolados duplo - resistentes entre os dicarboximidas e benzimidazóis são comuns devido às circunstâncias de controle de *B. cinerea*. Devido à utilização de dois fungicidas de modo de ação diferentes, o fungo adquire resistência para ambos fungicidas, simultaneamente. Isolados duplo - resistentes entre os benzimidazóis e outros fungicidas foram constatados por Chastagner e Ogawa (1979), obtendo-se linhagens de *B. cinerea* resistentes a benomyl e dicloran, em teste *in vitro*.

Diversos trabalhos relatam que isolados de *B. cinerea* foram resistentes a benomyl em ED₅₀ maior que 0,4±0,05 ppm (Ghini, 1996; Hsiang e Chastagner,

1992; Moorman e Lease, 1992; Northover e Matteoni, 1986; Papas, Cooke e Jordan, 1979; Dennis e Davis, 1979 e Cho, 1977), e não constataram nenhuma diferença entre isolados tolerante e sensível quanto ao crescimento micelial, esporulação, produção e viabilidade dos escleródios e patogenicidade.

No Brasil, poucos trabalhos relacionados à resistência de *B. cinerea* a fungicidas tem sido relatadas. Entretanto, problemas de ineficiência de fungicidas têm ocorrido, principalmente de plantas cultivadas em casas-de-vegetação, como as hortícolas, flores e de eucaliptos. Caldari Júnior (1998), testando vários isolados de *B. cinerea* provenientes de diferentes culturas e locais diferentes, confirmou a ocorrência de resistência para o benomyl. Os isolados cresceram na presença de 100 ppm de benomyl, fato que, de acordo com Cabrini (1985), possibilita caracterizá-los como resistentes. Alguns isolados demonstraram alto nível de resistência ao benomyl, crescendo na concentração de 1000 ppm do fungicida (Caldari Júnior, 1998). Ghini (1996) encontrou apenas 3 isolados sensíveis ao benomyl em 28 isolados de *B. cinerea* coletados em casas-de-vegetação, principalmente de flores e plantas ornamentais. Isolado de *B. cinerea*, agente causal do mofo cinzento em beringela, demonstrou ser resistente a benomyl e com baixa resistência a iprodione; sensível a captan, chlorotalonil e maior sensibilidade a mancozeb, e resistente a tiofanato metílico. Isolados de *B. cinerea* resistentes a benomyl, obtidos de eucalipto e morango, foram patogênicos quando inoculados em beringela (Ghini, 1990). De 52 isolados de *B. cinerea* coletados por Cabrini e Kimati (1986), na cultura do morangueiro, 12 apresentaram resistência a 100 µg/ml de benomyl, e 4 cresceram a 1000 µg/ml do fungicida, e os isolados resistentes esporularam e cresceram menos do que o sensível em meio de BDA, e todos os isolados apresentaram-se altamente sensíveis ao procymidone e ao iprodione.

Os fungicidas do grupo dos dicarboximidas (vinclozolin, iprodione e procymidone) atuam nos processos oxidativos (respiração) (Kimati, 1995); entretanto, de acordo com Pappas e Fisher (1979), todos os dicarboximidas têm modo de ação similar. Devido ao seu amplo espectro de ação, controlam importantes doenças, principalmente patógenos taxonomicamente relacionados (Sclerotiniaceae), incluindo *Sclerotinia*, *Monilinia* e *Botrytis* (Ghini, 1987), e também pelos problemas relativos ao surgimento de resistência de fungos aos dicarboximidas.

Em relação a ineficiência no controle do mofo cinzento em casas-de-vegetação, pelos fungicidas dicarboximidas, segundo Katan (1982), é provável que esteja ocorrendo o desenvolvimento da resistência aos fungicidas na população do patógeno de *B. cinerea*. Resultados demonstraram que em isolados nunca exposto a estes fungicidas, seus conídios não germinavam em meio BDA contendo 5µg/ml dos fungicidas, enquanto isolados já expostos a estes fungicidas, germinavam normalmente em meio de BDA com 100µg/ml de vinclozolin.

Stehmann e De Waard (1996) efetuaram teste com 121 isolado de *Botrytis cinerea* de vários países (França, Alemanha, Israel e Holanda). Os resultados demonstram que 100% dos isolados apresentavam resistência a benomyl (benzimidazol) e 71% a vinclozolin (dicarboximida). Os triazóis inibiram o crescimento micelial da maioria dos isolados, apenas um isolado da Alemanha mostrou-se pouco sensível a esse grupo de fungicida.

Isolados com baixo nível resistência cresceram em 2-4 mg/l de iprodione, produzindo macroconídios e escleródios com abundância, mas o crescimento micelial foi levemente menor que os isolados sensíveis. A mistura de captan + iprodione, reduziu apenas levemente o número de isolados resistente a iprodione comparado com áreas que só foram tratadas com iprodione. Porém, esta estratégia não previne o aumento de incidência de fungos resistente aos

dicarboximidas dentro de uma população de *B. cinerea* (Northoever e Matteoni, 1986).

Nenhuma relação entre resistência e AUDPC (área abaixo da curva de progresso da doença) foi detectada por Moorman e Lease (1992). Isolados resistentes foram tão variáveis em sua habilidade patogênica como o sensível, contrariando outros resultados, em que os isolados resistentes a dicarboximida tendem a ser menos virulentos e geralmente esporulam menos do que o sensível.

Diversos trabalhos demonstraram a resistência de *B. cinerea* aos fungicidas dicarboximidas (Ghini, 1996; Latorre e Flores, 1994; Moorman, Lease e Valli, 1994; Moorman e Lease, 1992; Vali e Moorman, 1992; Rewal, Coley-Smith e Sealy-Lewis, 1991; Chastagner e Vassey, 1979), em diferentes níveis de resistência, avaliadas quanto ao crescimento micelial, esporulação, produção de escleródios e patogenicidade. Recente trabalho realizado por Caldari Júnior (1998) demonstrou que os isolados estudados não apresentaram resistência ao fungicida do grupo dicarboximida iprodione, com exceção de um isolado, que apresentou crescimento na concentração de 100 ppm de iprodione, tendo apresentado resistência cruzada ao benzimidazol benomyl.

Nos últimos 30 anos, vários compostos foram pesquisados e desenvolvidos para o controle de fungos fitopatogênicos, com elevada ação tóxica, sendo classificados como inibidores da biosíntese de esteróis (SBI's). Os fungicidas classificados como SBI's inibem reações químicas e formação de compostos intermediários da síntese do ergosterol. Dentre o grupo de substâncias químicas que agem na formação de compostos intermediários, destacam-se os inibidores da reação de demetilação (DMI's), os quais inibem a passagem do lanosterol (1ª reação) para 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trienol (2ª reação). Este grupo compreende os fungicidas classificados como pirimidinas (fenarimol, nuarimol e triarimol), piridinas (butiobate), piperazinas (triforine), imidazóis

(imazalil, procloraz e triflumizole) e triazóis (triadimefon, triadimenol, propiconazole, difenoconazole, hexaconazole, epoxiconazole, tebuconazole, cyproconazole e tetraconazole). Outro grupo de fungicidas, como dimethomorph, fenpropenorph e tridemorph, são inibidores de reações de isomerização, ocorrendo entre os compostos fecosterol (10ª reação) e episterol (11ª). Compostos químicos identificados como azasteróis impossibilitam as reações de redução que ocorrem entre os compostos intermediários 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trienol (2ª reação) e 4,4-dimetil-colesta-8,24-dienol (3ª reação). Os azasteróis podem, ainda, inibir reações de transmetilação que ocorrem na cadeia lateral, entre os compostos zimosterol (5ª reação) e fecosterol (10ª reação), (Forcelini, 1994)

Os fungicidas triazóis apresentam modo de ação específico, atuando com um ou poucos modo de ação sobre o metabolismo do fungo, e são amplamente utilizados em cereais, frutíferas e olerícolas, no controle de patógenos que apresentam vários ciclos anuais (Köller e Scheinpflug, 1987; Smith e Köller, 1990). Em laboratório, os fungos são facilmente induzidos a produzirem mutantes resistentes aos triazóis. Tais fatores classificariam os triazóis como altamente propensos à ocorrência de resistência, não fosse a menor capacidade de competição apresentada pelos mutantes resistentes no campo (Dekker, 1985). Tal fato pode explicar as ocorrências parciais de reduções na eficiência desses fungicidas, geralmente associadas às adaptações temporárias do patógeno ao produto. Contudo, o uso frequente e isolado de compostos inibidores de reação de demetilação (DMI's) pode levar esses mutantes ao nível de estabilidade que determina a resistência, com a conseqüente perda de fungitoxicidade (Köller e Scheinpflug, 1987; Urech e Egli, 1991)

A presença de linhagens com decréscimo da sensibilidade não necessariamente implica em perda de controle no campo pelo DMI's. Isto depende do nível de resistência e frequência de esporos resistentes. Diversos

relatos nos quais houve redução da sensibilidade e/ou resistência do patógeno, foram encontrados: *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* em cevada (Fletcher e Wolfe, 1981), *Sphaerotheca fuligineai* em pepino (Schepers, 1983), *Pyrenophora teres* em cevada (Sheridan, Grbavac e Sheridan, 1985), *Venturia inaequalis* em maçã (Stanis e Jones, 1985), *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* em trigo (De Waard et al., 1986), *Rhynchosporium secalis* em cevada (Hunter, Jordan e Kendall, 1986), *Penicillium digitatum* em citros (Eckert, 1987), *Uncinula necator* em uva (Steva, Cartolaro e Gomes da Silva, 1990), *Pseudocercospora herpotrichoides* em trigo (Leroux e Marchegay, 1991), *Botrytis cinerea* em vegetais (Elad, 1992), *Mycosphaerella fijiensis* em banana (Anônimos, 1992), *Puccinia horiana* em crisântemo (Cevat, 1992) citados por De Waard, (1994).

No Brasil, apenas o trabalho realizado por Caldari Júnior (1998) detectou alguns isolados de *B. cinerea*, com possível resistência ao triazol difenoconazole, crescendo na concentração de 100 ppm do fungicida. Entretanto, trabalho feito por Ghini (1996) não detectou isolados de *B. cinerea* resistente ao triazol propiconazole.

Devido à reação cruzada entre fungicidas com mesmo modo de ação, não se realiza mistura e/ou alternância de triazóis, de imidazóis, de piridinas, de pirimidinas e de piperazinas. Com relação aos fungicidas classificados como morfolinás, e que agem na inibição da síntese de ergosterol em ponto diferente do metabolismo, os resultados disponíveis são contraditórios (Lorenz et al., 1992; Peever e Milgroom, 1992).

No Brasil, nenhum estudo de resistência de fungos ao fungicida tolilfluanid (similar ao dichlofluanid) foi descrito. Entretanto, tolilfluanid é um inibidor muito eficaz da germinação de esporos e de micélio. Numerosos estudos sobre o mecanismo de ação do tolilfluanid mostram que o ingrediente ativo, pertencente ao grupo de bloqueadores de SH (grupo tiol), que interfere no

metabolismo da célula do fungo), atua de modo não específico em numerosos locais. O princípio de ação baseia-se na interação direta do ingrediente ativos com grupos SH (grupo tiol) de proteínas contendo enxofre, enzimas ou constituintes das células com baixo teor molecular, como a coenzima A (Corrêio Agrícola, 1995)

Dichlofluanid e chlorotalonil têm sido usados como alternativas consideradas de baixo risco para o fungo adquirir a resistência. Malathrakis (1989) constatou isolados de *Botrytis cinerea* resistente ao dichlofluanid, na concentração maior ou igual a 81 µg/ml, quando avaliou o crescimento micelial e germinação dos esporos. Isolado com baixo nível de resistência a dichlofluanid teve o EC₅₀ para o crescimento micelial de 3,2 µg/ml, e os ultra baixo resistentes de 1,3 µg/ml (Rewal, Coley-Smith e Sealy-Lewis, 1991).

De 76 isolados coletados em casas-de-vegetação, 55 delas apresentaram isolados resistente ao dichlofluanid, em que ocorreu falha no controle da doença, sendo esse o primeiro relato de resistência ao dichlofluanid. Nas casas-de-vegetação que apresentaram pouco inóculo de *B. cinerea*, os fungicidas dichlofluanid, captan e chlorotalonil foram eficazes contra o mofo cinzento. Em nenhum relato a resistência cruzada ainda foi descrito, porém podem ocorrer a outros ftalamidas (folpet e captafol), em que o modo de ação é similar ao thiran, ao chlorotalonil e ao dichlofluanid, que tem modo de ação similar ao captan (Rewal, Coley-Smith e Sealy-Lewis, 1991).

O isolado resistente a dichlofluanid foi também ao vinclozolin porém, o isolado resistente a dichlofluanid revelou falta de adaptabilidade quando comparado com o isolado sensível (Rewal, Coley-Smith e Sealy-Lewis, 1991).

Caldari Júnior (1998), avaliando a sensibilidade de *B. cinerea* nunca expostos ao fungicida azoxystrobin, encontrou grande variabilidade do crescimento micelial *in vitro* dos resultados obtidos, encontrando isolados que

criaram entre 1 e 1000 do azoxystrobin. De acordo com Caldari Júnior (1998), estes resultados discordam do conceito de resistência de fungos a fungicidas.

Segundo Wade (1994), quando não se pode evitar o emprego de um determinado fungicida propenso a induzir resistência, deve-se minimizar a pressão de seleção exercida por ele sobre o patógeno através de: a) aplicação somente em épocas críticas do ano; b) redução da dose e frequência de aplicação ao mínimo necessário para um controle econômico; c) seleção de um método de aplicação que minimize a exposição do patógeno ao químico; d) limitação da área tratada; e) aplicação do produto, curativamente, logo após o início da infecção; f) aplicação do produto em combinação com outras medidas de controle.

Em uma estratégia de aplicação de um fungicida, não há nenhum modelo, pois ocorrem muitas interações entre cultura/patógeno/fungicida/meio ambiente; entretanto, alguns princípios podem ser aplicados, como minimizar a exposição da população do patógeno a um produto químico, embora mantendo um nível aceitável de controle da doença. Para isto, torna-se necessário estabelecer o nível tolerável da doença na cultura estudada sem acarretar-lhe perdas econômicas, evitando, assim, a aplicação excessiva de fungicidas. O incremento de monitoramento e de sistema de previsão de doença, bem como o uso mais adequado de variedades resistentes e novas tecnologias de aplicação de fungicidas, são fatores muito importantes dentro da sistemática de uso de fungicidas (Georgopoulos, 1994; Staub; 1991 e Gilpatrick, 1983).

Nesta última década, têm sido formuladas misturas de tanque de fungicidas de sítio específico com fungicidas de contato, visando minimizar os problemas relativos à resistência de patógenos a estes produtos. Resultados favoráveis empregando misturas de fungicidas como estratégia foram encontrados por Sanders et al. (1985), Samoucha e Gisi (1987) e Samoucha e Cohen (1988). Como medida preventiva contra a resistência de fungos a fungicidas, empresas

formuladoras estão introduzindo, no mercado, a pré-misturas de fungicidas sistêmicos, mais fungicidas protetores, como: thiran + carboxin, mancozeb + metalaxyl, cyproconazole + oxiclureto de cobre, tiofanato metílico + chlorotalonil (Compêndio, 1999).

Estudos realizados com fungicidas no controle de *B. cinerea*, vários relatos indicam a eficiência *in vitro* e *in vivo* dos benzimidazóis e dicarboximidas. Entretanto, poucos trabalhos têm sido realizados com outros fungicidas, como os triazóis e outros compostos não testados no controle do patógeno. Vários trabalhos relacionados à resistência de *B. cinerea* a fungicidas indicam a facilidade deste fungo de adquirir a resistência aos benzimidazóis e dicarboximidas, quando o fungo sofre pressão de seleção por estes fungicidas. Diversos trabalhos relatam que além de adquirir a resistência, o fungo adapta-se à pressão de seleção do fungicida, causando infecções e disseminações.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 803p.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John wiley sons, 1995. 869p.
- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prática de produtos fitossanitários par uso agrícola**. 5. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1999.
- ANÔNIMOS. Sterol biosynthesis inhibitors - risk of resistance and recommended antiresistance strategies. Recommendations of the FRAC-DMI-working group for 1992. **Gesunde Pflanzen**, v.44, p.361-365, 1992.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO – ABRACAVE. Belo Horizonte: ABRACAVE, 1993.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE PAPEL E CELULOSE. **Relatório estatístico**. São Paulo, 1993, 240p.
- BAYER. **Corrêio Agrícola**. 2. Ed. São Paulo: Bayer, 1995. 23p.
- BEEVER, R.E.; LARACY, E.P.; PAK, H.A. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. **Plant Pathology**, Oxford, v.38, n.3, p.427-437, june 1989.
- CABRINI, H. M. **Ocorrência de isolados de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr resistentes a benomyl em morangos (*Fragaria* spp.) no Estado de São Paulo**. Piracicaba: ESALQ, 1985. 66p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- CABRINI, H. M.; KIMATI, H. **Ocorrência de isolados de *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr resistente a benomyl em morangos (*Fragaria* spp.) no estado de São Paulo**. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.12, n.1/2, p.16, jan./june 1986.

- CALDARI JÚNIOR, P. Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais. Piracicaba: ESALQ, 1998. 51p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- CEVAT, H. Japanese rosette terug van nooit weggeweest. nu maatregelen nemen om aantasting in najaar te voorkomen. *Vakblad Voor de Bloemisterij, Netherlands*, v.29, p.32-33, 1992.
- CHASTAGNER, G.A.; OGAWA, J.M. A fungicide-wax treatment to suppress *Botrytis cinerea* and protect fresh-market tomatoes. *Phytopathology*, St. Paul, v.69, n.1, p.59-63, jan. 1979.
- CHASTAGNER, G.A.; VASSEY, W.E. Tolerance of *Botrytis cinerea* to glycophene and vinclozolin. *Phytopathology*, St. Paul, v.69, p.914, 1979.
- CHO, J.J. Shoot and flower blight of *Leucospermum cordifolium* incited by a benomyl-tolerant strain of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, St. Paul, v.67, n.1, p.124-127, jan. 1977.
- DAUGHTREY, M.L.; WICK, R.L.; PETERSON, J.L. *Compendium of flowering potted plant diseases*. St Paul: APS Press, 1995. 90p.
- DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and resistance. In: DELP, C.J.(ed). *Fungicide resistance in North America*. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap. 3, p.25-27.
- DEKKER, J. Acquired resistance to fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, Califórnia, v.14, p.405-428; 1976.
- DEKKER, J. The development of resistance to fungicides. *Program Pesticide Biochemistry Toxicological*, v.4, p.165-218. Epton & Richmond, 1985.
- DEKKER, J. Introduction. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S.G. (eds) *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen: Centre for agricultural publishing and documentation, 1982. p.1-6.

- DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R.W. *Systemic fungicides*. 2. ed. London: Butler & Tanner, 1977. cap. 9, p. 176-197.
- DELP, C.J.; DEKKER, J. Fungicide resistance: Definitions and use of terms. *EPPO Bulletin*, v.15, p.333-335, 1985.
- DENNIS, C.; DAVIS, R.P. Tolerance of *Botrytis cinerea* to iprodione and vinclozolin. *Plant Pathology*, Oxford, v.28, n.3, p.131-133, sept. 1979.
- DE WAARD, M.A. Resistance to fungicides which inhibit sterol 14 alpha-demethylation, an historical perspective. In: HEANEY, S.; SLAWSON, D.; HOLLOMON, D.W.; SMITH, M.; RUSSELL, P.E.; PARRY, D.W. (eds) *Fungicide resistance*. Farnham: The British crop Protection Council, 1994. 418p. (BCPC Monograph n. 60.)
- DE WAARD, M.A.; KIPP, E.M.C.; HORN, N.M.; VAN NISTELROOY, J.G.M. Variation in sensitivity to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in wheat powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.92, p.21-32, 1986.
- ECKERT, J.W. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. In: DELP, C.J. (ed) *Fungicide resistance in North America*. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap. 1, p.1-3.
- ELAD, Y. Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: fenetrazole and fenethanil. *Plant Pathology*, Oxford, v.41, n.1, p.47-54, feb. 1992.
- ELAD, Y.; GULLINO, M.L.; SHTIENBERG, D. et al. *Managing Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. *Crop Protection*, Sunney, v.14, p.105-109, feb. 1995.
- FAO FOREST PRODUCTS YEARBOOK. Rome: FAO, v.27, 1992.
- FERREIRA, F.A *Enfermidades do eucalipto no Brasil*. *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, v.18, n.186, p.5-19, 1997.

- FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal: principais doenças no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.
- FLETCHER, J.S.; WOLFE, M.S. Insensitivity of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* to triadinefon, triadimenol and other fungicides. **Brighton Crop Protection Conference: Pests and Disease** - 1981, p.633-640.
- 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.
- GEORGOPOULOS, S.G. Development of fungal resistance to fungicides. In: DIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. (eds) **Antifungal Compounds - Interactions in biological and ecological systems**, v.2, 1977. cap.12, 673p.
- GEORGOPOULOS, S.F. Genetics and population dynamics. In: DELP, C.J. **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap. 1, p.12-13.
- GHINI, R. Ocorrência e adaptabilidade de linhagens de *Botrytis squamosa* resistentes a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas. Piracicaba: ESALQ, 1987. 114p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- GHINI, R. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.21, n.2, p.285-288, jun 1996.
- GHINI, R. Ocorrência e sensibilidade colateral de linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes a benzimidazóis em beringela, em registro, SP. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.16, n.1, p.36, jan/mar. 1990.
- GILPATRICK, J.D. Management of resistance in plant pathogens. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (ed) **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum Press, 1983. p.735-767.
- HAWKSWORH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. **Dictionary of the fungi**. 8. ed. Cambridge: University Press, 1995. 616p.

- HSIANG, T.; CHASTAGNER, G.A. Production and viability of sclerotia from fungicide-resistant and fungicide-sensitive isolates of *Botrytis cinerea*, *B. elliptica* and *B. tulipae*. **Plant Pathology**, Oxford, v.41, n.5, p.600-605, oct. 1992.
- HUNTER, T.; JORDAN, V.W.; KENDALL, S.J. Fungicides sensitivity changes in *Rhynchosporium secalis* in glasshouse experiments. **British Crop Protection Conference: Pests and Disease**. p.523-536, feb. 1986.
- JARVIS, W.R. Taxonomy. In: COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W.R. **The biology of Botrytis**. New York: Academic Press, 1980. Cap.1, p.1-18.
- KATAN, T. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ("dicarboximide") fungicides in grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. **Plant Pathology**, Oxford, v.31, n.2, p.133-141, june 1982.
- KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds) **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.46-95.
- KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. **Agrotécnica CIBA-GEIGY**, São Paulo, v.1, 5-7, 1987.
- KÖLLER, W.; SCHEINPFLUG, H. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, n.12, p.1066-1074, dec. 1987.
- KRUGNER, T. L.; AUER, C.G. Doenças do eucalipto. In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (eds) **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.358-375.

- KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds) *Manual de fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.46-95.
- LATORRE, B.A.; FLORES, V.; SARA, AM.; ROCO, A. Dicarboximide-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grape in Chile: Survey and characterization. *Plant Disease*, St. Paul, v.78, n.10, p.990-994, oct. 1994.
- LEROUX, P.; MARCHEGAY, P. Caractérisation des souches de *Pseudocercospora herpotrichoides*, agent du piétin-verse des céréales au prochloraze, isolées en France sur blé tendre d'hiver. *Agronomie*, Versailles, v.11, p.767-776, 1991.
- LOCKE, T.; FLETCHER, J.T. Incidence of benomyl and iprodione resistance in isolates of *Botrytis cinerea* in tomato crops in England and Wales in 1986. *Plant Pathology*, Oxford, v.37, n.1, p.381-384, mar. 1988.
- LORBEER, J.W.; VINCELLI, P.C. Efficacy of dicarboximide fungicides and fungicide combinations for control of botrytis leaf blight of onion in New York. *Plant Disease*, St. Paul, v.74, n.3, p.235-237, mar. 1990.
- LORENZ, G. Dicarboximide fungicide. In: DELP, C.J. (ed) *Fungicide resistance in North America*. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.4, p.45-58.
- LORENZ, G.; SAUR, R.; SCHELBERGER, K.; FORSTES, B.; KUNG, R.; ZOBRIST, P. Long term monitoring results of wheat powdery mildew sensitivity towards fenpropimorph and strategies to avoid the development of resistance. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference, Pests Diseases Brighton*, BCPC, 1992.
- 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.

- MILLER, M.W.; FLETCHER, J.T. Benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* isolates from glasshouse crops. **Transactions British Mycological Society**, London, v.62, n.1, p.99-103, 1974.
- MILLER, M.W.; JEVES, T.M. The persistence of benomyl, tolerance in *Botrytis cinerea* in glasshouse tomato crops. **Plant Pathology**, Oxford, v.28, n.3, p.119-122, sept. 1979.
- MONTEIRO, A.J.A. Avaliação da remoção de restos culturais e de fungicidas na intensidade do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casa de vegetação. Viçosa: UFV, 1996. 70 p. (Tese – Mestrado em Fitopatologia).
- MOORMAN, G.W.; LEASE, R.J. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, n.4, p.477-480, apr. 1992.
- MOORMAN, G.W.; LEASE, R.J. & VALLI, R.J. Bioassay for dicarboximide resistance in *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, n.9, p.890-891, sept. 1994.
- 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, n.4, p.398-402, apr. 1986.
- PANAYOTAKOU, M.; MALATHRAKIS, N.E. Resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicides in protected crops. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.102, n.2, p.293-299, 1983.
- PAPPAS, A.C.; COOKE, B.K.; JORDAN, V.W.L. Insensitivity of *Botrytis cinerea* to iprodione, procymidone and vinclozolin and their uptake by the fungus. **Plant Pathology**, Oxford, v.28, n.2, p.71-76, june 1979.

- PAPPAS, A.C.; FISHER, D.J. A comparison fo the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science*, Oxford, v.10, n.3, p.239-246, mar. 1979.
- PEEVER, T.L.; MILGROOM, M.G. Genetic correlations in resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology*, St. Paul, v.76, n.10, p.1076-82, mar. 1993.
- 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, n.4, p.554-560, dec. 1991.
- SAMOUCHA, Y.; COHEN, Y. Synergistic interaction of cymoxanil mixtures in the control of metalaxyl - resistant *Phytophthora infestans* of potato. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n.6, p.636-640, june 1988.
- SAMOUCHA, Y.; GISI, U. Use of two and three - way mixtures to prevent buildup of resistance to phenylamide fungicides against *Phytophthora* and *Plasmopora*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.10, p.1405-1409, oct. 1987.
- SANDER, P.L.; HOUSER, W.J.; PARISH, P.J.; COLE Jr, H. Reduced - rate fungicide mixtures to delay fungicides resistance and to control selected turfgrass diseases. *Plant Disease*, St. Paul, v.69, n.8, p.939-943, aug. 1985.
- SCHEPERS, H.T.A.M. Decreased sensitivity of *Sphaeroteca fuliginea* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.89, p.185-187, 1983.
- SHERIDAN, J.E.; GRBAVAC, N.; SHERIDAN, M.H. Triadimenol insensitivity in *Pyrenophora teres*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v.85, p.338-341.

- SMITH, C.M. Benzimidazole fungicides. In: DELP, C.J. (ed) **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.3, p.23-44.
- SMITH, F.D.; KÖLLER, W. The expression of resistance of *Ustilago avenae* to the sterol demethylation inhibitor triadimenol is an induced response. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, n.6, p.584-590, june 1990.
- SOUZA, M.G. **Etiologia e controle do tombamento de mudas de eucalipto, causado por *Botrytis cinerea*, no estágio de fechamento de canteiros**. Viçosa: UFV, 1991. 53p. (Tese - Mestrado).
- STANIS, V.F.; JONES, A.L. Reduced sensitivity to sterol-inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, n.10, p.1098-1101, oct. 1985.
- STAUB, T. Fungicides resistance: practical experience with anti-resistance strategies and the role of integrated use. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, Califórnia, v.29, p.421-442, 1991.
- STEHMANN, C.; DE WAARD, M.A. Biological activity of triazole fungicides towards *Botrytis cinerea*. In: LYR, H.; RUSSELL, P.E.; SISLER, H.D. (eds) **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. cap. 15, p.125-128.
- STEVA, H.; CARTOLARO, P.; GOMES da SILVA, M.T. Tolerance of powdery mildew of SBI fungicides: situation for 1989. **Phytoma**, Boulogne, v.419, p.41-44, 1990.
- URECH, P.A.; EGLI, T.A. FRAC - Grupo de ação de resistência a fungicidas: reflexão dez anos após sua criação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.17, n.1, p.85-89, fev. 1991.

- VALI, R.J.; MOORMAN, G.W. Influence of selected fungicide regimes on frequency of dicarboximide-resistant and dicarboximide-sensitive strains of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, St. Paul, v.76, n.9, p.919-924, sept. 1992.
- WADE, M. Resistance to fungicides. *Span*, Oxon, v.25, p.8-10, 1982.
- WADE, M. Strategies for preventing or delaying the onset of resistance to fungicides and for managing resistance occurrences. In: DELP, C.J. (ed) *Fungicide resistance in North America*. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.1, p.13-14.
- 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 (*Eucalyptus* sp), por fungicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Calda. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol.22, n.2, p.320, aug. 1997.

CAPÍTULO 2

SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Botrytis cinerea* A FUNGICIDAS.

1 RESUMO

KIMURA, Mauro Koozo. Sensibilidade *in vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas. Lavras: UFLA, 1999. 132p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)

Testes *in vitro* são realizados para avaliar a sensibilidade de fungos patogênicos a fungicidas. Experimentos foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças do Departamento de Fitopatologia/UFLA, para avaliar a sensibilidade de isolado de *Botrytis cinerea* a fungicidas. O isolado foi obtido de viveiro de mudas de eucalipto, onde são feitas intensivas pulverizações com os fungicidas benomyl, tiofanato metílico, iprodione, procymidone e captan. Utilizou-se o método do fungicida incorporado ao meio de cultura BDA, misturas de fungicidas incorporado ao meio, inibição da germinação, teste de erradicação micelial e de escleródios, frequência de conídios resistentes a fungicidas e indução a produção de escleródios por fungicidas. De fato, quando o isolado demonstrou menor sensibilidade micelial aos fungicidas em uso no controle do patógeno, demonstrou ser altamente sensível aos fungicidas do grupo dos triazóis, ao fungicida tolilfluanid, e insensível ou pouco sensível à outros fungicidas. A mistura do fungicida tebuconazole com outros fungicida, demonstrou para algumas misturas na concentração de 1 ppm (procymidone, captan e benomyl) a melhoria da eficiência, e para (dodine, tolilfluanid, iprodione

Comitê Orientador: Paulo Estevão de Souza - UFLA (Orientador), Mário Lúcio Vilela Resende - UFLA, Mário Sobral de Abreu - UFLA, Ricardo Magela de Souza - UFLA.

e triforine) a diminuição da eficiência, no entanto, todas as misturas foram altamente eficazes na concentração de 100 ppm, devido a grande eficiência do tebuconazole. A mistura entre fungicidas aplicados no viveiro, foi na maioria altamente eficientes, com exceção da mistura entre captan, benomyl e tiofanato metílico, que foram altamente ineficazes, mesmo na concentração de 100 ppm. Os fungicidas triazóis demonstraram inibição da germinação conidial. Benomyl, tiofanato metílico e procymidone com menor inibição. Os fungicidas triazóis, dicarboximidas, captan e tolilfluanid apresentaram efeito na erradicação micelial, e benomyl, dodine, azoxystrobin e triforine, não foram capazes na erradicação micelial. Os triazóis e tolilfluanid apresentaram grande eficiência na erradicação de escleródios nas concentrações acima de 500 ppm, e outros fungicidas como benomyl, procymidone, iprodione e captan demonstraram pouca ou nenhuma eficiência na erradicação de escleródios mesmo em altas concentrações, sendo ainda grandes indutores na produção de escleródios, fato que não ocorreu com o tolilfluanid. O isolado de *B. cinerea* em estudo, demonstrou adquirir resistência ao fungicida benomyl, que pelo teste de germinação de conídios, desenvolveu igualmente a testemunha, e o isolado demonstrou insensibilidade ao fungicida azoxystrobin.

2 ABSTRACT

KIMURA, Mauro Koozo. *In vitro* sensitivity of *Botrytis cinerea* to fungicides. Lavras: UFLA, 1999. 132p. (Dissertation - Master in Phytopathology)

In vitro tests are conducted to evaluate the sensitivity of pathogenical fungi to fungicides. Experiments were undertaken in the Laboratory of Epidemiology and Diseases Management of the Department of Phytopathology/UFLA, to evaluate the sensitivity of isolate of *Botrytis cinerea* to fungicides. The isolate was obtained from a nursery of eucalyptus cuttings where intensive spraying are done with the fungicide benomyl, thiophanate-methyl, iprodione, procymidone and captan. The method of the fungicide incorporated with PDA culture medium, mixtures of fungicides incorporated with the medium, germination inhibition, mycelial and sclerotium eradication tests, frequency of fungicide resistant spores and induction sclerotium production by fungicides. In fact, when the isolate showed less mycelial sensitivity to the fungicides in use in the control of the pathogen, it proved to be highly sensitive to the fungicides of the triazol group, to the fungicidal tolylfluanid and insensitive or little sensitive to the other fungicides. The mixture of the fungicide tebuconazole with another fungicide, showed to some mixtures at the concentration of 1 ppm, (procymidone, captan and benomyl), improved efficiency and to (dodine, tolylfluanid, iprodione and triforine) the decrease of efficiency, nevertheless, all the mixtures were highly effective at the concentration of 100 ppm, due to the great efficiency of tebuconazole. The mixture among fungicides applied in the nursery was in most cases, highly efficient with exception of the mixture between captan, benomyl and

Guidance Committee: Paulo Estevão de Souza - UFLA (Adviser), Mário Lúcio Vilela Resende - UFLA, Mário Sobral de Abreu - UFLA, Ricardo Magela de Souza - UFLA.



thiophanate-methyl, which were greatly inefficient, even at the concentration of 100 ppm. The triazol fungicides showed inhibition of spores germination benomyl, thiophanate-methyl and procymidone with less inhibition. The triazol fungicides, dicarboximidaz, captan and tolylfluanid presented effects on mycelial eradication and benomyl, dodine, azoxystrobin and triforine were not able in mycelial eradication. The triazols and tolylfluanid showed great efficiency in eradicating sclerotium at the concentrations above 500 ppm and other fungicides as benomyl, procymidone, iprodione and captan showed either little or no efficiency in the eradication of sclerotium even at high concentrations, they still being great inducers in the production of sclerotium, a fact which didn't occur with tolylfluanid. The isolated of *B. cinerea* under study, showed to acquire resistance to the fungicide benomyl, showed by the spores germination test developed equally the check and the isolated showed insensibility to the fungicide azoxystrobin.

3 INTRODUÇÃO

O controle de doenças causada por *Botrytis* é extremamente difícil porque eles são capazes de infectar a cultura em quase todos os estádios de seu crescimento e armazenamento e afetar todas as partes da planta, incluindo cotilédones, folhas, hastes, flores, frutos e raízes. Algumas espécies, particularmente *Botrytis cinerea*, representam uma ameaça constante porque o fungo ocorre ao longo do ciclo útil da espécie cultivadas e hospedeiros selvagens. Podem também persistir em plantas debilitadas mortas no solo. Nessas circunstâncias, o tratamento preventivo em certas partes da planta pode não ser suficiente para proteger outros tecidos.

Atualmente, não existem fungicidas recomendados para o controle de tombamento de mudas ou mofo cinzento, associado a *B. cinerea*, na cultura do eucalipto no Brasil (Compêndio, 1999). Utilizam-se, portanto, as recomendações definidas para outras culturas. Entretanto, o uso inadequado e sem acompanhamento técnico, aumenta o risco do surgimento de formas resistentes do fungo a fungicidas.

Powelson (1960) demonstrou que frutos de morango não foram diretamente infectados pelo fungo *B. cinerea*, mas foram secundariamente invadidas pelo fungo em estado latente, previamente infectado por algum tempo nas partes florais. Esse fato explica, geralmente, o melhor desempenho da rotina das pulverizações pré-colheita no controle da podridão dos frutos, em oposição da pulverização na estação da colheita. O reconhecimento do estado latente determina a realização do tratamento preventivo da cultura apenas quando o sintoma da doença torna-se aparente, devendo ser pulverizado antes da lesão aparecer.

Em culturas no campo, fungicidas protetores, como captan, dichlofluanid, chlorotalonil, dicloran e dithiocarbamatos, particularmente thiran, têm sido usados em pulverizações com alto volume no controle do mofo cinzento do morango (Maude, 1980). Alguns fungicidas, como 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 e Smith, 1994). Com exceção do thiabendazole, outros compostos como benomyl, tiofanato metílico e carbendazin resultam em similares níveis de controle do mofo cinzento no morangueiro e similar controle na videira (Jordan, 1973). No final da década de 70, fungicidas do grupo das dicarboximidas, como os fungicidas iprodione, vinclozolin e procymidone, foram intensivamente aplicados no controle do mofo cinzento (Lorenz, 1994). Entretanto, vários trabalhos têm relatado a ocorrência de isolados de *B. cinerea* resistente ou tolerante aos fungicidas dos grupos benzimidazoles (Smith, 1994) e dicarboximidas (Delp, 1994).

O presente trabalho visou estudar a sensibilidade *in vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas, em diferentes métodos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do isolado de *Botrytis cinerea*

Para avaliar a sensibilidade de *Botrytis 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. A coleta foi feita no mês de outubro de 1996, no microjardim clonal, o qual é local de grande pressão de inóculo e de intensiva aplicação de fungicidas.

Após coletadas, as mudas foram levadas para o laboratório, colocadas em câmara úmida e incubadas sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 4 dias de incubação, com auxílio de agulha esterilizada, uma massa conidial do fungo foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata 200 g – dextrose 20 g – ágar 20g). Essas placas foram incubadas por 7 dias em câmara de crescimento, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, obtendo-se, assim, um intenso crescimento micelial e esporulação do fungo.

O isolado obtido foi preservado por meio de repicagens tubo a tubo, usando-se como substrato o meio BDA inclinado em tubos de 1,5 x 15 cm, mantidos em geladeira ($\pm 8^\circ\text{C}$). As repicagens foram feitas a cada 6 meses.

4.2 Sensibilidade micelial de *Botrytis cinerea* a fungicidas

O bioensaio empregado foi o de incorporação de fungicidas no meio BDA. Os fungicidas foram incorporados ao meio fundido a uma temperatura entre 45-50°C, e em seguida vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Logo após solidificado o meio, discos de 7 mm de diâmetro contendo o inóculo foram colocados no centro das placas de Petri. As placas foram incubadas na câmara de crescimento, em temperatura de 22±2°C, com fotoperíodo de 12 horas. O ingrediente ativo dos fungicidas, modo de ação e concentrações, encontram-se na Tabela 1.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 77 tratamentos e 4 repetições, sendo uma placa por parcela. Os tratamentos foram os fungicidas (azoxystrobin, toliifluanid, dodine, triforine, procymidone, dimethomorph, dithianon, imibenconazole, captan, folpet, benomyl, iprodione, tebuconazole, triadimenol, difenoconazole, propiconazole, cyproconazole, tiofanato metílico, quintozene) 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, na perpendicular, usando uma régua graduada em milímetro (mm). Diante dos dados, os tratamentos fungicidas, com todas as suas concentrações, foram submetidas a uma análise de regressão, obtendo-se o ED₅₀ (concentração do ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial do isolado). Avaliou-se também a concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, intervalo entre concentrações dos fungicidas capaz de inibir totalmente o crescimento micelial do fungo.

Após o cálculo do ED₅₀, o isolado de *B. cinerea* foi classificado em 4 categorias de sensibilidade *in vitro* aos fungicidas, segundo escala de Edgington, Khew e Barron (1971), onde:

ED₅₀ < 1 ppm: alta sensibilidade (AS); ED₅₀ 1 - 10 ppm: moderada sensibilidade (MS); ED₅₀ 10 - 50 ppm: baixa sensibilidade(BS); ED₅₀ > 50 ppm: insensibilidade (I).

Diante do cálculo do ED₅₀, os fungicidas foram classificados em 4 categorias de eficiência *in vitro* dos fungicidas, de acordo com a escala de Bollen e Fuchs (1970), Edgington, Khew e Barron (1971) e Kataria e Grover (1978) citada por Parisi (1997), onde:

ED₅₀ < 1 ppm: alta eficiência (AE); ED₅₀ 1 - 10 ppm: modera eficiência (ME); ED₅₀ 10 - 50 ppm: baixa eficiência (BE); ED₅₀ > 50 ppm: ineficiência (I).

TABELA 1 – Fungicidas utilizados nos bioensaios de *Botrytis cinerea*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

I.A ¹	N.C ²	G.Q ³	Tipo	Modo de Ação	Concentração do I.A
Azoxystrobin.	Anistar	Estrobirulinas	Sistêmico	Inib. da resp. mitocondrial	800 g/Kg
Benomyl	Benlate	Benzimidazóis	Sistêmico	Inib. da mitose (tubulina)	500 g/L
Captan	Orthocide	Falimidas	Protetor	Multissítios	500 g/Kg
Chlorotalonil	Dacostar	Comp. Aromáticos	Protetor	Multissítios	750 g/Kg
Cyproconazole	Alto 100	Triazóis	Sistêmico	Inib. da biossíntese de esteróis	250 g/L
Difenoconazole	Score	Triazóis	Sistêmico	Inib. da biossíntese de esteróis	250 g/L
Dimethomorph	Forum	Morfolinas	Protetor	Inib. da biossíntese de esteróis	250 g/L
Dithianon	Delan	Antraquinonas	Protetor	Inib. da biossíntese de esteróis	500 g/Kg
Dodine	Venturol	Guanidinas	Protetor	Multissítios	750 g/Kg
Folpet,	Folpan	Falimidas	Protetor	Multissítios	650 g/Kg
Imibenconazole*	Manage*	Triazóis	Sistêmico	Inib. da biossíntese de esteróis	500 g/Kg
Iprodione	Rovral	Dicarbouximidas	Sistêmico	Inib. da biossíntese de esteróis	150 g/Kg
Procyimidone	Sialex	Dicarbouximidas	Sistêmico	Proccs. oxidativos (respiração)	500 g/L
Propiconazole	Tilt	Triazóis	Sistêmico	Proccs. oxidativos (respiração)	500 g/L
Quintozene	Kobutol	Nitrobenzozenos	Sistêmico	Inib. da biossíntese de esteróis	500 g/Kg
Tebuconazole	Folicur	Triazóis	Erradicante	Multissítios	750 g/Kg
Tiofanato Metílico	Cercobin	Benzimidazóis	Sistêmico	Inib. da biossíntese de esteróis	250 g/L
Tolilfluand	Euparen	Deriv. de Anilinas	Protetor	Inib. da mitose (tubulina)	700 g/Kg
Triadimenol	Bayfidan	Triazóis	Sistêmico	Multissítios	500 g/Kg
Triforine	Saprol	Piperazinas	Sistêmico	Inib. da biossíntese de esteróis	250 g/L

* em fase de registro
1) Ingrediente Ativo
2) Nome Comercial
3) Grupo Químico

--- desconhecido

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

O método empregado foi o de incorporação de fungicidas no meio BDA. Para a obtenção das misturas, os fungicidas foram incorporados um a um ao meio fundido a uma temperatura entre 45-50°C, e em seguida vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, e logo após solidificado o meio; discos de 7 mm de diâmetro, contendo micélio, foram colocados no centro das placas de Petri. As placas foram incubadas na câmara de crescimento, em temperatura de 22±2°C, com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. O ingrediente ativo dos fungicidas, modo de ação e concentrações, encontram-se na Tabela 01.

O delineamento experimental adotado no 1º bioensaio foi o inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e 4 repetições, sendo uma placa por parcela. Os tratamentos foram os fungicidas tebuconazole, misturados com azoxystrobin, tolilfluanid, dodine, triforine, procymidone, captan, benomyl, iprodione, tiofanato metílico e tebuconazole, utilizado isoladamente, sendo em 2 concentrações (1 e 100 ppm) e mais a testemunha sem fungicida.

No 2º bioensaio, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente causalizado, com 11 tratamentos e 3 repetições, sendo uma placa por parcela. Os tratamentos das misturas de fungicidas foram: iprodione+benomyl, iprodione+tiofanato metílico, iprodione+captan, iprodione+procymidone, benomyl+tiofanato metílico, benomyl+captan, benomyl+procymidone, tiofanato metílico+captan, tiofanato metílico+procymidone, captan+procymidone, todas em duas concentrações (1 e 100 ppm) e mais a testemunha sem fungicida.

Após o período de incubação, avaliou-se o diâmetro do crescimento micelial, medindo em dois sentidos na sua perpendicular, usando uma régua graduada em milímetro (mm). Diante dos dados, os tratamentos fungicidas foram comparados com a testemunha calculando-se o percentual de inibição do crescimento micelial (P.I.C), citado por Edgington, Khew e Barron (1971), por

meio da fórmula (PIC) e submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey, individualmente para cada concentração de 1 e 100 ppm.

$$\text{P.I.C} = \frac{[(\text{cresc. da testemunha} - \text{cresc. do tratamento})/\text{cresc. da testemunha}] * 100$$

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

Para avaliar a inibição da germinação dos esporos, utilizou-se isolado de *B. cinerea* incubado, igualmente ao item 4.1., porém por dez dias, obtendo-se uma densa massa micelial e conidial. Por um processo de filtragem da massa micelial mais conidial, obteve-se uma suspensão de conídios de *B. cinerea* contendo água destilada mais Tween 80 a 1%, e sua concentração ajustada a $2,0 \times 10^8$ esporos/ml com auxílio de um hemacitômetro.

O teste adotado foi o da diluição de fungicidas em água destilada. As concentrações fungicidas foram preparadas em 5 ml de água destilada, obtendo-se as concentrações de 2, 20, 100 e 200 ppm. Amostras de 50 µl da suspensão conidial foram depositadas em lâminas escavadas, e em seguida, 50 µl da concentração do fungicida preparado foram depositados sobre a suspensão de conídios e misturados, obtendo-se as concentrações dos fungicidas de 1, 10, 50 e 100 ppm com uma suspensão conidial de $1,0 \times 10^4$ conídios/ml. As lâminas escavadas foram colocadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo, em seu interior, duas folhas de papel de filtro previamente umedecidas com água destilada, e em seguida incubadas no escuro sob temperatura ambiente (20-25°C).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 52 tratamentos e 4 repetições, sendo uma lâmina escavada por parcela. Utilizaram-se, para os tratamentos, os seguintes fungicidas: azoxystrobin, tolifluanid, dodine, procymidone, captan, benomyl, iprodione, tebuconazole,

triadimenol, difenoconazole, propiconazole, tiofanato metílico, 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 após 16 horas de incubação, com base em 100 conídios avaliados, realizados sob microscópio estereoscópio no aumento de 100x. Considerou-se, como conídios germinados, aqueles que apresentavam um tubo germinativo com comprimento de, no mínimo, uma a duas vezes o maior diâmetro do esporo. Para análise dos dados, utilizou-se a sobreposição do intervalo de confiança, com 95% de probabilidade.

4.5 Erradicação de micélio de *Botrytis cinerea*

Para avaliação da erradicação de micélio de *B. cinerea*, utilizaram-se discos das bordas do crescimento micelial, incubadas durante sete dias. Preparou-se o meio de BDA a 3 % (batata 200g – dextrose 20g – ágar 30g), que foi fundido e um pequeno volume do meio a 3% foi vertido sobre placas de Petri, e rapidamente homogeneizado, obtendo-se uma fina película. Em seguida, discos de 7 mm de diâmetro de cultura de *B. cinerea* foram retirados das bordas das colônias, e transferidos para as placas contendo a película de BDA a 3%. Após três dias de incubação a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, o novo micélio desenvolvido na película foi tratado com 10 ml dos fungicidas preparado em água destilada esterilizada. Após dois minutos de tratamento, a suspensão fungicida foi descartada. Cinco discos de 7 mm de diâmetro da película micelial tratada, foram transferidos por placa de Petri contendo BDA a 2%.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 29 tratamentos em 3 repetições, sendo uma placa com 5 discos da película micelial por parcela. Para os tratamentos, utilizaram-se os seguintes fungicidas:

azoxystrobin, benomyl, iprodione, procymidone, captan, tiofanato metílico, toliifluanid, triadimenol, tebuconazole, difenoconazole, propiconazole, cyproconazole, triforine e dodine, em duas concentrações de 100 e 1000 ppm, mais a testemunha sem tratamento fungicida.

As avaliações foram realizadas após quatro dias de incubação, como no item 4.1., contando-se o número de colônias desenvolvidas e não desenvolvidas, a partir dos discos de película micelial tratados. Os dados foram transformados em porcentagem de discos erradicado pelos fungicidas. Para análise dos dados, utilizou-se a sobreposição do intervalo de confiança, com 95% de probabilidade.

4.6 Erradicação de escleródios de *Botrytis cinerea*

Os escleródios foram produzidos em grande quantidade por meio de cultivo em meio BDA, como descrito no item 4.1., e incubados por 20 dias.

Os escleródios produzidos foram retirados com o auxílio de uma pinça, picados com uma lâmina de aço inox e transferidos para tubos de ensaio (15x1,5cm) contendo a calda fungicida previamente diluído em água destilada esterilizada. Após cinco minutos de imersão na solução fungicida, os escleródios foram transferidos para placas de Petri (9 cm) contendo BDA, e em seguida foram incubados à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 37 tratamentos em 4 repetições, sendo uma placa com 5 escleródios por parcela. Como tratamentos, utilizaram-se os seguintes fungicidas: toliifluanid, captan, iprodione, procymidone, triforine, dodine, difenoconazole, tebuconazole e azoxystrobin, em 4 concentrações (100, 500, 1000 e 2000 ppm) e como testemunha, meio de cultura sem fungicida.

Após três dias de incubação, realizou-se a avaliação, determinando-se a porcentagem de escleródios que não germinaram. Para análise dos dados,

utilizou-se a sobreposição pelo intervalo de confiança, com 95% de probabilidade.

Após avaliação, algumas placas foram incubadas no escuro à temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ por mais 12 dias, obtendo-se, assim, a indução da produção de escleródios por fungicidas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 21 tratamentos e 2 repetições, sendo uma placa por parcela. Os tratamentos constituíram-se dos fungicidas benomyl, tolilfluanide e captan, nas concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 ppm, procymidone nas concentrações de 100, 1000 e 2000 ppm e iprodione nas concentrações de 1000 e 2000 ppm, e mais a testemunha sem fungicida.

As avaliações foram realizadas após período de incubação, contando-se o número de escleródios produzidos por placa.

4.7 Frequência de conídios de *B. cinerea* resistentes a fungicidas

Para avaliar a frequência de conídios resistentes a fungicidas, incubou-se o isolado de *B. cinerea*, igualmente ao item 4.1., porém por dez dias, obtendo-se uma densa massa micelial e conidial. Por um processo de filtragem da massa micelial mais conidial, obteve-se uma suspensão de conídios em solução aquosa de Tween 80 a 1%, e sua concentração ajustada a $2,0 \times 10^8$ esporos/ml. Em seguida, 200 μl da suspensão conidial foram depositados sobre as placas de Petri com meio BDA mais os fungicidas, previamente incorporado ao meio de cultura nas concentrações de 100 e 1000 ppm. A suspensão conidial foi homogeneamente espalhadas em toda área da placa e incubada, como no item 4.1., durante 15 dias.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 24 tratamentos em 4 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de

Petri. Os tratamentos consistiram dos fungicidas benomyl, azoxystrobin, triforine, triadimenol, difenoconazole, tebuconazole, propiconazole, procymidone, iprodione, captan, tolilfluanid e dodine, em duas concentrações de 100 e 1000 ppm, e mais a testemunha sem fungicida.

As avaliações foram realizados diariamente, contando-se o número de colônias formadas, até o preenchimento total das placas por colônias durante o período de 15 dias, sendo contado um número máximo de 120 colônias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sensibilidade micelial de *B. cinerea* a fungicidas

O isolado em estudo, de modo geral, demonstrou sensibilidade aos fungicidas avaliados (Tabela 2 e 3).

Dentre os fungicidas do grupo dos DMI's (inibidores de reação de demetilação), o fungo demonstrou alta sensibilidade ao tebuconazole, propiconazole e imibenconazole, com ED₅₀ calculado menor que 1 ppm. Resultados semelhantes foram encontrados por Ghini (1996) para o triazol propiconazole quando o ED₅₀ também ficou abaixo de 1 ppm, com pequena insensibilidade para alguns isolados avaliados, com concentração mínima inibitória (CMI) de 100 ppm. A CMI do propiconazole, utilizada neste ensaio, ficou entre 1 e 10 ppm, tendo este fungicida maior potencial no controle do *B. cinerea* do que o fungicida tebuconazole, com CMI entre 100 e 1000 ppm. Apesar do baixo ED₅₀ para o imibenconazole, este apresentou uma CMI maior que 1000 ppm, comportando-se com certa ineficiência, resultado também encontrado por Yamashita et al. (1997) quando isolados de *B. cinerea* cresceram em 1000 ppm de imibenconazole. Os outros fungicidas DMI's comportaram-se com moderada sensibilidade, como para o difenoconazole, cyproconazole, triadimenol e triforine, com o ED₅₀ variando de 1 a 10 ppm. Do mesmo modo, Caldari Júnior (1998) encontrou, para o triazol difenoconazole, verificando extrema sensibilidade dos isolados ao fungicida, mas alguns isolados demonstraram certa insensibilidade, desenvolvendo-se no meio com 100 e/ou 1000 ppm do fungicida. Esses resultados demonstram que os 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 e De Waard (1996), o uso dos triazóis pode ser limitado no controle do mofo cinzento no campo, pelo fato da seleção de mutantes resistentes pelos triazóis.

Dentre os fungicidas continuamente aplicados sobre o patógeno em estudo, o isolado foi altamente sensível aos fungicidas iprodione e procymidone, com ED_{50} calculado < 1 ppm. Porém, os fungicidas procymidone e iprodione permitiram o crescimento micelial em altas concentrações com a CMI acima de 1000 ppm, provavelmente o isolado deve estar adaptando-se às condições de pressão de seleção dos fungicidas. Resultados semelhantes foram encontrados por Ghini (1996) quando a maioria dos isolados avaliados tiveram o seu ED_{50} abaixo de 1 ppm, porém com concentração mínima inibitória de 100 ppm. O fungo comportou-se com baixa sensibilidade ao fungicida benomyl, com ED_{50} entre 10 e 50 ppm, e para os fungicidas tiofanato metílico e captan, o isolado comportou-se como insensível, com ED_{50} acima de 50 ppm. A insensibilidade do isolado aos fungicidas benomyl e tiofanato metílico confirma 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 e Lease (1992), onde encontraram isolados com resistência cruzada aos fungicidas do grupo dos benzimidazóis.

Para os fungicidas ainda não utilizados no controle do patógeno, o isolado comportou-se altamente sensível ao toliifluanid, com $ED_{50} < 1$ ppm. Malathrakis (1989) também obteve resultados semelhantes, e detectou isolado resistente ao dichlofluanid na concentração de 81 ppm, o qual é um produto similar ao toliifluanid (Rewal, Coley-Smith e Sealy-Lewis, 1991). Para os fungicidas dodine e quintozene, o fungo comportou-se com moderada sensibilidade, com valores do ED_{50} entre 1 e 10 ppm. O fungo demonstrou insensibilidade para os fungicidas

folpet, dithianon, azoxystrobin e dimethomorph, com $ED_{50} >$ que 50 ppm. Para o fungicida azoxystrobin, do grupo das estrobilulinas, Caldari Júnior (1998) encontrou grande variação no crescimento micelial de isolados provavelmente ainda não expostos a esse fungicida, no qual o ED_{50} situou-se abaixo de 0,1 ppm e para outros em 1000 ppm, indicando que esse composto não tem nenhuma ou pouca influência no crescimento micelial *in vitro*, discordando também do conceito de resistência de fungos a fungicidas. Mesmo em altas concentrações, os fungicidas azoxystrobin, folpet, dithianon, quintozene e dimethomorph não foram capazes de inibir o fungo, comportando-se como ineficientes.

Vários trabalhos relatam a eficiência de fungicidas benzimidazóis (Smith, 1994) e dicarboximidas (Lorenz, 1994) contra *B. cinerea*. Entretanto, observou-se que alguns fungicidas avaliados não foram eficientes na inibição do crescimento micelial. Este resultado provavelmente pode estar relacionado à resistência do isolado a fungicidas.

TABELA 2 - Equações de regressão, valores médio de ED₅₀ (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 ²	ED ₅₀	S ¹⁾	E ²⁾
Difenoconazole	$Y=1.2516x^2-14.6865x+50.1880$	0.95	1.43	MS	ME
Tebuconazole	$Y=0.8804x^2-9.0911x+28.2175$	0.95	< 1	AS	AE
Cyproconazole	$Y=1.5229x^2-16.8175x+50.6069$	0.95	1.41	MS	ME
Triadimenol	$Y=1.5219x^2-16.9621x+51.8745$	0.95	1.52	MS	ME
Propiconazole	$Y=1.0087x^2-10.0161x+28.7832$	0.95	< 1	AS	AE
Triforine	$Y=-0.5149x^2-3.3420x+50.7558$	0.95	4.11	MS	ME
Imibenzonazole	$Y=0.9588x^2-9.9274x+37.4954$	0.95	< 1	AS	AE
Tiofanato Metílico	$Y=0.3039x^2-2.3857x+90.8496$	0.95	> 1000	I	I
Benomyl	$Y=0.7787x^2-12.5315x-72.1760$	0.95	13.24	BS	BE
Procymidone	$Y=0.5843x^2-5.6650x+37.2865$	0.95	< 1	AS	AE
Iprodione	$Y=0.8189x^2-5.7655x+42.9041$	0.95	< 1	AS	AE
Captan	$Y=-3.0573x^2+14.2356x+56.7544$	0.95	215.28	I	I
Dimethomorph	$Y=-1.4963x^2+9.7692x+55.1508$	0.95	> 1000	I	I
Tolilfluanid	$Y=1.4828x^2-15.2931x+42.6173$	0.95	≤ 1	AS	AE
Folpet	$Y=3.3493x^2+14.9335x+75.7800$	0.95	404.16	I	I
Dithianon	$Y=-3.7202x^2+22.2539x+51.1735$	0.95	516.73	I	I
Azoxystrobin	$Y=-2.2182x^2+15.6961x+54.8881$	0.95	> 1000	I	I
Dodine	$Y=0.6662x^2-10.9364x+51.6288$	0.95	1.87	MS	ME
Quintozene	$Y=0.7100x^2-8.6055x+55.7338$	0.95	4.10	MS	ME

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

2) AE (alta eficiência), ME (moderada eficiência), BE (baixa eficiência), I (ineficiente)

TABELA 3 - Valores médio de porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Botrytis cinerea* e a concentração mínima inibitória (CMI)^{1\}. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fungicidas	Concentrações (ppm)				CMI
	1	10	100	1000	
Difenoconazole	44.58 ^{2\}	89.16	90.96	100	100-1000
Tebuconazole	72.74	97.59	100	100	10-100
Cyproconazole	45.03	88.55	100	100	10-100
Triadimenol	43.22	88.25	98.49	100	100-1000
Propiconazole	71.54	100	100	100	1-10
Triforine	52.26	45.18	93.37	100	100-1000
Imibenzonazole	61.30	88.86	90.96	91.42	> 1000
Tiof. Metílico	0.15	0.00	8.28	0.00	> 1000
Benomyl	20.18	53.16	70.63	80.87	> 1000
Procymidone	62.95	76.36	79.82	77.11	> 1000
Iprodione	53.92	75.00	61.14	59.64	> 1000
Captan	4.37	46.84	51.36	94.13	> 1000
Dimethomorph	47.59	10.54	37.80	43.22	> 1000
Tolilfluanid	54.07	96.23	100	100	10-100
Folpet	16.42	4.07	8.73	89.61	> 1000
Dithianon	51.05	2.26	20.18	75.90	> 1000
Azoxystrobin	45.93	6.33	15.36	38.70	> 1000
Dodine	43.98	77.41	85.99	100.00	100-1000
Quintozene	39.76	63.86	68.67	72.59	> 1000

1\ Intervalo entre concentrações, onde pode-se encontra valores de 100% de inibição do crescimento micelial.

2\ Média de 4 repetições

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

A sensibilidade micelial de *B. cinerea* em meio BDA com misturas de fungicidas está apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Verifica-se que com 1 ppm dos fungicidas utilizados em mistura com 1 ppm do fungicida tebuconazole, quando comparadas com o fungicida tebuconazole utilizado isoladamente, a mistura com azoxystrobin, triforine, tiofanato metílico, benomyl, captan e procymidone comportou-se igualmente. Quando se compara os fungicidas aplicados isoladamente e os fungicidas misturados com tebuconazole, nota-se que para os fungicidas captan, procymidone e benomyl, ocorreram interações entre os fungicidas positivamente. Essa interação pode ser observada pelo aumento da inibição micelial ser superior ao do fungicida tebuconazole e dos fungicidas aplicados isoladamente. Isto indica que os modos de ação dos fungicidas utilizados na mistura agem de forma independente. Os fungicidas azoxystrobin e tiofanato metílico não foram eficientes; 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 comparadas 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 dos fungicidas misturadas com 100 ppm de tebuconazole, todos foram eficientes na inibição do crescimento micelial, não podendo dizer se ocorreu interação positiva ou negativa, ou seja, se houve compatibilidade ou incompatibilidade entre os ingredientes ativos. Os resultados demonstram que nem sempre a mistura de 2 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 eficientes na inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*. As demais misturas que não contêm o procymidone demonstraram ser ineficazes para inibir o crescimento micelial do fungo. Já as misturas entre benomyl, tiofanato metílico e captan proporcionaram total crescimento micelial do fungo, com grande probabilidade desse isolado ser resistente aos fungicidas do grupo benzimidazóis.

TABELA 4 - Porcentual de inibição micelial de *B. cinerea* por misturas de fungicidas com tebuconazole, nas concentrações de 1 e 100 ppm. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Tratamentos	Concentrações (ppm)				Tratamentos	Concentrações (ppm)			
	1		100			1		100	
Azoxystrobin + Tebuconazole	74.64	cde ¹	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	bcd
					Iprodione	53.91	c	61.14	bc
CV (%)	21.62		0.86		CV (%)	29.82		15.66	

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

53

TABELA 5 - Porcentual de inibição micelial de *B. cinerea* por misturas entre fungicidas nas concentrações de 1 e 100 ppm. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Tratamentos	Concentrações (ppm)				Tratamentos	Concentrações (ppm)			
	1		100			1		100	
Iprodione + Captan	29.65	a ¹	97.31	d ¹	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 ²	-	-	47.31	c	Tiofanato metílico	0.15	a	8.28	a
Benomyl + Tiofanato metílico ²	-	-	10.56	a	-	-	-	-	-
Procymidone + Captan	97.16	c	98.76	d	-	-	-	-	-
Procymidone + Tiof. metílico	99.52	c	98.45	d	-	-	-	-	-
Tiofanato metílico + Captan ²	-	-	30.91	b	-	-	-	-	-
CV (%)	4.86		4.30		CV (%)	36.80		25.68	

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

2\ Excluídos da análise estatística (1 ppm).

Na avaliação entre as misturas com 100 ppm dos fungicidas, observou-se grande eficiência na inibição do crescimento micelial do fungo quando se utilizaram as misturas que contêm os fungicidas iprodione e/ou procymidone. Este resultado é um grande indicativo de que os fungicidas do grupo dos dicarboximidas mantiveram-se eficientes, apesar do isolado já ter entrado em contato com esse grupo de fungicida. Apesar da provável resistência do isolado aos benzimidazóis, o isolado demonstrou ser sensível ao dicarboximidas. Entretanto, as misturas entre benomyl, tiofanato metílico e captan proporcionam pouca inibição do crescimento micelial do fungo, resultado semelhante ao da concentração de 1 ppm, comprovando que este isolado provavelmente tenha adquirido resistência aos fungicidas benomyl e tiofanato metílico, e estes interferiram no modo de ação do captan quando são misturados.

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

Os resultados das avaliações da sensibilidade da germinação de conídios de *B. cinerea* podem ser observados na Tabela 6.

Observa-se que na concentração de 1 ppm, os fungicidas benomyl, iprodione, captan e dodine demonstraram maior ou igual capacidade de germinação em relação à testemunha. Os fungicidas benomyl, captan e iprodione são intensivamente aplicados sobre o patógeno em estudo, demonstrando que o isolado, em baixa pressão de seleção, é capaz de manifestar conídios resistentes, seguido pelo fungicida tiofanato metílico, que demonstrou capacidade maior de inibir a germinação do fungo. Estatisticamente, os fungicidas tiofanato metílico e azoxystrobin proporcionaram o mesmo nível de germinação, seguidos por procymidone, propiconazole e triadimenol. E os fungicidas tebuconazole, difenoconazole e tolilfluanid proporcionaram total ou pouca germinação.

Na avaliação utilizando-se 10 ppm dos fungicidas, com exceção do benomyl, todos os fungicidas proporcionaram germinação de conídios inferior à testemunha. A igualdade entre a testemunha e o benomyl, na germinação conidial, pode estar relacionada à resistência do fungo a este fungicida. Os fungicidas azoxystrobin e tiofanato metílico proporcionaram um nível de germinação pouco inferior à testemunha, com nível intermediário de germinação proporcionado pelo procymidone, e com alto nível e inibição total da germinação de conídios, pelos fungicidas dodine, tebuconazole, triadimenol, difenoconazole, propiconazole, captan e tolitfluanid, respectivamente.

Quando utilizaram 50 ppm dos fungicidas, todos comportaram-se com eficiência na inibição da germinação conidial. Os fungicidas azoxystrobin e benomyl foram os que mantiveram maiores níveis de germinação, seguidos por procymidone e tiofanato metílico, com nível intermediário, e os demais fungicidas inibiram totalmente a germinação conidial de *B. cinerea*.

Na concentração de 100 ppm dos fungicidas, todos comportaram-se com eficiência na inibição da germinação conidial de *B. cinerea*. E os dados estatísticos são semelhantes aos da concentração de 50 ppm.

Pode-se observar que os conídios tratados com os fungicidas benomyl e azoxystrobin mantiveram níveis médio de germinação semelhantes em todas as concentrações avaliadas. À medida que se aumentavam as concentrações dos fungicidas benomyl e azoxystrobin, a tendência da germinação conidial no meio com os fungicidas era mantida constante. Acredita-se que *B. cinerea* é naturalmente insensível a azoxystrobin e adquiriu resistência a benomyl, resultado este compatível ao citado por Davidse (1994). O contrário ocorreu com os fungicidas procymidone e tiofanato metílico. À medida que aumentaram as concentrações, ocorreram decréscimos na germinação conidial. Provavelmente, os fungicidas procymidone e tiofanato metílico foram poucos utilizados no controle

TABELA 6 - Porcentagem 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 ¹⁾	76.75 ²⁾ 0.6751 ³⁾ - 0.8478 e ⁴⁾	73 0.6319 - 0.8139 d	75 0.6534 - 0.8312 c	76.25 0.6642 - 0.8397 c
Tebuconazole	1.75 0.0024 - 0.0703 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a
Triadimenol	32 0.2302 - 0.4207 b	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a
Difenoconazole	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a
Propiconazole	23.75 0.1602 - 0.3357 b	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a
Iprodione	86.25 0.7762 - 0.9212 e	3.5 0.0110 - 0.0992 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a
Azoxystrobin	40 0.3032 - 0.5027 bc	46.5 0.3598 - 0.5625 c	35 0.2572 - 0.4518 b	36.5 0.2664 - 0.4624 b
Benomyl	71.50 0.6213 - 0.8052 de	96 0.9007 - 0.9889 e	59 0.4871 - 0.6873 c	49.5 0.3983 - 0.6016 b
Captan	93 0.8610 - 0.9713 ef	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a
Tiof. Metílico	53.75 0.4374 - 0.6401 cd	38.25 0.2847 - 0.4825 c	16.75 0.1022 - 0.2581 b	8.5 0.0351 - 0.1515 a
Tolilfluaniid	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a
Dodine	85.75 0.7762 - 0.9212 e	6.0 0.0223 - 0.1260 ab	0 0.0000 - 0.0362 a	0 0.0000 - 0.0362 a
Procymidone	28.25 0.1947 - 0.3786 b	17.25 0.1022 - 0.2581 b	19.25 0.1184 - 0.2806 b	3.25 0.0062 - 0.0851 a

1) tratamento utilizado como testemunha, total de 400 conídios avaliados

2) dados originais

3) intervalo de confiança inferior e superior

4) dados que sobrepõem um ao outro, seguidas pela mesma letra, são iguais entre si (p = 95)

desse patógeno nesta área, não tendo o isolado tempo suficiente para adquirir resistência. Os fungicidas do grupo das dicarboximidas (iprodione e procymidone) demonstraram eficiência na inibição da germinação, o mesmo ocorreu com os fungicidas protetores captan, tolilfluanid e dodine. Os fungicidas triazóis (tebuconazole, difenoconazole, triadimenol e propiconazole) demonstraram grande poder de inibição de germinação. Este resultado contraria os trabalhos de Monteiro (1996), que observou ineficiência na inibição de germinação de conídios. Pode-se observar que alguns fungicidas sistêmicos agem também de forma protetora, evitando a germinação de conídios.

5.4 Erradicação micelial de *B. cinerea* por fungicidas

Os resultados da avaliação da erradicação micelial de *B. cinerea* por fungicidas podem ser observados na Tabela 7.

Dentre os fungicidas avaliados na concentração de 100 ppm, o fungicida protetor captan demonstrou alto efeito erradicativo do crescimento micelial, seguido pelos fungicidas tolilfluanid, benomyl, iprodione e procymidone; entretanto, inferior ao fungicida captan. Os fungicidas azoxystrobin, tiofanato metílico, triadimenol, tebuconazole, difenoconazole, cyproconazole, triforine e dodine não foram capazes de erradicar micélios do fungo nessa concentração. Os fungicidas iprodione, captan, procymidone, tebuconazole, difenoconazole e propiconazole foram altamente eficientes na erradicação micelial somente na concentração de 1000 ppm, seguida por tolilfluanid, cyproconazole e dodine. Com valores próximos ou semelhantes à testemunha, os fungicidas azoxystrobin, benomyl, tiofanato metílico, triadimenol e triforine não foram capazes de erradicar o micélio, igualando-se estatisticamente à testemunha.

Os fungicidas protetores, nas concentrações avaliadas, foram efetivos na prevenção do crescimento micelial sobre o meio de cultura BDA, demonstrando

que, principalmente captan e tolilfluanid, possuem potencial eficiência na erradicação de *B. cinerea*, nas concentrações entre 100 e 1000 ppm, podendo, estes fungicidas, ser utilizados no tratamento de partes vegetais, erradicando micélio fúngico, localizado na parte externa, agindo de forma protetora e erradicante.

Alguns fungicidas DMI's possuem eficiência na proteção e erradicação de crescimento micelial de *B. cinerea*, podendo, os fungicidas tebuconazole, propiconazole e difenoconazole, ser utilizados nas concentrações entre 100 e 1000 ppm. Estes triazóis possuem potencial de erradicar partes vegetais infectados pelo micélio, localizados na parte externa e interna do órgão vegetal, agindo de forma protetora e erradicante. Entretanto, os fungicidas triadimenol, triforine e cyproconazole não possuem o efeito preventivo contra o crescimento micelial. Isto demonstra que existe algum diferencial, na constituição da molécula do triazol, que o torna mais ativo ou não. Os fungicidas do grupo das dicarboximidas (iprodione e procymidone) demonstraram eficiência para prevenir e erradicar o crescimento micelial do fungo. Resultado semelhante foi obtido por Souza (1991) quando erradicou micélio de *B. cinerea* com 200 ppm de procymidone. Os fungicidas do grupo dos benzimidazóis e o azoxystrobin demonstraram-se ineficientes para a erradicação micelial. Este fato pode estar relacionado à resistência do fungo ao benomyl, pois trabalho feito por Souza (1991) erradicou micélio de *B. cinerea* na concentração de 35 ppm.

TABELA 7 – Porcentagem de erradicação micelial de *Botrytis cinerea* e intervalo de confiança exato para a variável binomial da erradicação micelial. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Tratamento	Concentrações (ppm)			
	100	1000		
Testemunha	0 ^{1\}	0		
	0.0000 ^{2\} – 0.0362	d ^{3\}	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\ dados originais

2\ intervalo de confiança inferior e superior

3\ média seguida pela mesma letra não difere entre si a 95 % de probabilidade

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

Os resultados da avaliação da erradicação e/ou inviabilização de escleródios de *B. cinerea* por fungicidas podem ser observados na Tabela 8.

Os melhores tratamentos fungicidas para a erradicação e/ou inviabilização dos escleródios foram aqueles que sofreram tratamentos com fungicidas protetores. O melhor fungicida protetor foi o tolilfluanid, demonstrando grande capacidade de inibir a germinação dos escleródios entre 100 e 1000 ppm do ingrediente ativo, apesar de uma relativa perda da eficiência a 2000 ppm. O fungicida dodine também demonstrou ser menos eficiente, porém com grande variação na concentração utilizada de 500 a 2000 ppm. Com menor eficiência, o fungicida captan inibiu quase totalmente a germinação dos escleródios a 100 ppm; porém, em concentrações entre 500 e 2000 ppm, a sua eficiência diminuiu quase a metade. De acordo com Rewal, Coley-Smith e Sealy-Lewis, (1991), captan e dichlofluanid apresentam modos de ação similar, entretanto, o fungicida tolilfluanid, um similar ao dichlofluanid, demonstrou maior eficiência. Este fato pode estar relacionado ao melhor modo de ação do tolilfluanid, apresentando maior fungitoxicidade. A menor sensibilidade de escleródios do isolado ao captan pode estar relacionada à resistência ou adaptabilidade do isolado ao captan, pois este isolado foi proveniente de área com intensivas aplicações do captan e não do tolilfluanid.

Dentre os fungicidas sistêmicos, destacou-se o fungicida tebuconazole, inviabilizando a germinação dos escleródios, quando se usaram concentrações a partir de 500 ppm. Os outros fungicidas sistêmicos (benomyl, iprodione, procymidone, difenoconazole e triforine) demonstraram ineficiência para a inviabilização dos escleródios, permitindo a germinação dos escleródios em todas as concentrações. A ineficiência demonstrada pelos fungicidas benomyl, iprodione e procymidone pode estar relacionada à resistência do isolado a estes

Tabela 8 - Porcentual 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 ^{1\}		0		0		0	
	0.0000 ^{2\} -0.0362	b ^{3\}	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	d
Tolilfuanid	100		100		100		54.77	
	0.9637-1.000	a	0.9637-1.000	a	0.9637-1.000	a	0.4472-0.6496	b
Benomyl	0		0		0		0	
	0.0000-0.0362	b	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	d
Captan	95.45		43.19		40.40		10	
	0.8871-0.9835	a	0.3313-0.5328	b	0.3032-0.5027	b	0.04901-0.1762	c
Iprodione	0		0		0		0	
	0.0000-0.0362	b	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	d
Procymidone	0		0		0		0	
	0.0000-0.0362	b	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	d
Triforine	0		0		0		0	
	0.0000-0.0362	b	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	d
Dodine	0		94.45		60.45		100	
	0.0000-0.0362	b	0.8739-0.9776	a	0.4972-0.6967	b	0.9637-1.0000	a
Difenoconazole	0		0		0		0	
	0.0000-0.0362	b	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	d
Tebuconazole	0		100		100		100	
	0.0000-0.0362	b	0.9637-1.0000	a	0.9637-1.0000	a	0.9637-1.0000	a
Azoxystrobin	0		0		0		0	
	0.0000-0.0362	b	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	c	0.0000-0.0362	d

1\ dados originais. 2\ limite inferior e limite superior. 3\ tratamentos com letras diferentes nas colunas, diferem estatisticamente a 95% de probabilidade.

fungicidas. Também pode ser relacionada a resistência “física” dos escleródios aos fungicidas sistêmicos, os quais agem de forma sistêmica e não por contato, ou seja, o fungicida tem que ser ingerido pelo fungo para causarem efeito. A pulverização de fungicidas sistêmicos, nesse caso, pode induzir a produção de escleródios. Entretanto, apesar do mesmo grupo químico, tebuconazole, ter sido superior ao difenoconazole, este fato pode estar relacionado à molécula química do ingrediente ativo, o qual é diferenciado dos outros pela localização do radical da molécula base do triazol (Forcelini, 1994).

5.6 Frequência de conídios de *B. cinerea* resistentes a fungicidas

Observa-se que a maioria dos fungicidas que apresentam eficiência contra *B. cinerea*, no bioensaio de inibição do crescimento micelial (Tabela 2 e 3), não foram capazes de induzir conídios resistentes (Tabela 9). Dentre os fungicidas que demonstraram eficiência, apenas o fungicida benomyl selecionou conídios resistentes, apresentando germinação conidial igual à testemunha. Os fungicidas procymidone e dodine também foram capazes de selecionar conídios resistentes, porém em menores proporções que o benomyl. Outro fungicida que se apresentou como a testemunha foi o fungicida azoxystrobin, entretanto, este não demonstra ser eficiente contra o *B. cinerea*.

A igualdade na germinação conidial entre a testemunha e benomyl demonstra a grande presença de esporos mutantes resistentes ao fungicida benomyl, estando a frequência numa relação de 1 para 83. De acordo com (Brent, 1995), numa relação semelhante de 1 em 100 ou 1 em 10 na população, há dificuldade de controle da doença e a presença de mutantes resistentes é facilmente detectada. Provavelmente, devido às diversas aplicações com fungicida benomyl, a proporção do mutante foi aumentada.

TABELA 9 - Número de colônias de *Botrytis cinerea* formadas no meio contendo fungicidas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Tratamento	Concentrações (ppm)	
	100	1000
Testemunha	120	120
Benomyl	120	120
Azoxystrobin	120	120
Triforine	0	0
Triadimenol	0	0
Difenoconazole	0	0
Tebuconazole	0	0
Propiconazole	0	0
Procymidone	0	26.5
Iprodione	0	0
Captan	0	0
Tolilfluanid	0	0
Dodine	34	0

Caldari Júnior (1998) encontrou isolados que foram sensíveis e insensíveis, em teste *in vitro*, quando testou isolados que não tiveram contato com o fungicida. O isolado estudado não sofreu pressão de seleção pelo fungicida azoxystrobin, mas comportou-se com insensibilidade ao fungicida, ou seja, o modo de ação do azoxystrobin provavelmente não é capaz de afetar importantes rotas metabólicas vitais do fungo.

A seleção de linhagem resistente ao procymidone pode estar relacionada ao seu modo de ação, semelhante ao dos fungicidas vinclozolin e iprodione. De acordo com Pappas e Fisher (1979), todos os dicarboximidas tem semelhança no modo de ação. Entretanto, iprodione não selecionou linhagem resistente provavelmente devido à concentração do fungicida utilizado ser eficiente ou aos

modos de ação dos dicarboximidas não serem totalmente similares, sendo necessário, portanto, mais estudos sobre o modo de ação dos dicarboximidas.

Por ainda não ter sido exposto aos fungicidas do grupo dos DMI's, o isolado de *B. cinerea* não foi capaz de selecionar mutante resistente. Para os fungicidas protetores que apresentam multi-sítios de ação, como o captan e tolilfluanid, o isolado não foi capaz de selecionar mutante resistente, mesmo sabendo que o isolado recebeu forte pressão de seleção pelo captan.

5.7 Indução a produção de escleródios de *B. cinerea* por fungicidas

De acordo com a Tabela 10, pode-se observar a indução da produção de escleródios por tratamento fungicida.

Após 15 dias da incubação, notou-se que as culturas provenientes de estacas que não receberam tratamento fungicida não foram capazes de produzir novos escleródios. Entretanto, quando os escleródios foram submetidos ao tratamento por imersão em calda fungicida, elas foram incapazes de se multiplicar.

O fungicida tolilfluanid demonstrou induzir poucos escleródios em todas as concentrações avaliadas. Isto pode estar relacionado à eficiência do fungicida na erradicação de escleródios ou à inviabilização dos escleródios diante do fungicida, já que este demonstrou grande efeito a partir de 100 ppm. O fungicida captan, demonstrou menor efeito na produção de escleródios. A partir da concentração de 1000 ppm, entretanto, em concentrações inferiores, este fungicida demonstrou ser grande indutor na produção de escleródios. Devido ao fato do isolado de *B. cinerea* em estudo, ter provável resistência ao fungicida benomyl, este fungicida foi capaz de induzir a produção de escleródios em todas as concentrações avaliadas. Quando os escleródios foram imersos na calda fungicida, demonstrou efeito inverso, ou seja, além de não ter efeito na

erradicação e/ou inviabilização dos escleródios, este fungicida demonstrou induzir a produção de escleródios. Os fungicidas iprodione e procymidone, mesmo não tendo efeito na erradicação e/ou inviabilização de escleródios, demonstraram efeito na indução da produção de escleródios, com valores abaixo do fungicida benomyl.

Esta diferença pode estar relacionado ao isolado, ou seja, isolado este proveniente de área que recebeu intensivas aplicações dos fungicidas benomyl, captan, iprodione e procymidone, e somente o fungicida tolilfluanid ainda não foi aplicado sobre o patógeno, demonstrando a grande sensibilidade dos escleródios ao fungicida tolilfluanid. Para os demais fungicidas, os escleródios do isolado demonstraram menor sensibilidade ou até mesmo resistência a estes fungicidas, com mais adaptação ao fungicida benomyl.

TABELA 10 - Número de escleródios reproduzidos por *Botrytis cinerea*, após tratamento de escleródios com fungicidas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Tratamentos	Concentrações (ppm)				Média
	100	500	1000	2000	
Testemunha	0	0	0	0	0
Benomyl	19	49	40.5	62	42.62
Tolilfluanid	0	4	4	14	5.5
Captan	60	48	0	11	29.75
Iprodione	---	---	33.5	0	16.75
Procymidone	20	---	27.5	20	22.5

--- não testados

6 CONCLUSÕES

- 1) O isolado de *Botrytis cinerea* em estudo demonstrou menor sensibilidade aos fungicidas benomyl, tiofanato metílico, iprodione, procymidone e captan.
- 2) Dentre os fungicidas do grupo dos inibidores de reação de demetilação (DMI's), somente os triazóis (tebuconazole, triadimenol, difenoconazole, propiconazole e cyproconazole) demonstraram alta eficiência na inibição *in vitro* de *B. cinerea*.
- 3) O fungicida protetor tolilfluanid demonstrou grande eficiência contra *B. cinerea*.
- 4) O isolado de *B. cinerea* demonstrou insensibilidade aos fungicidas dithianon, dimethomorph, quintozene, folpet e azoxystrobin.
- 5) Os fungicidas dodine, triforine e imibenconazole apresentaram potencial na inibição do fungo.
- 6) As misturas de fungicidas envolvendo tebuconazole apresentaram altos índices de eficiência.
- 7) Misturas de fungicidas entre benomyl, tiofanato metílico e captan foram ineficazes na inibição de *B. cinerea*.
- 8) As misturas contendo os fungicidas procymidone e/ou iprodione são eficientes no controle de *B. cinerea*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 5. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1999.
- BOLLEN, G.J.; FUCKS, A. **On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl**. *Netherland Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.76, p.299-313, 1970.
- BRENT, K.J. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be changed**. Brussels: GIFAP, 1995. 48p. (FRAC monograph, 1).
- CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. Piracicaba: ESALQ, 1998. 51p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- DAVIDSE, L.C. **Benzimidazole fungicides: mechanism of action and resistance**. In: DELP, C.J. (ed) **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap. 3, p.25-27.
- DELP, C.J. **Dicarboximide fungicides**. In: DELP, C.J. (ed) **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. p.45-57.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. **Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds**. *Phytopathology*, St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, jan. 1971.
- 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, n.2, p.285-288, jun. 1996.

- JORDAN, V.W.L. The effects of prophylactic spray programmes on the control of pre- and post-harvest diseases of strawberry. *Plant Pathology*, Oxford, v.22, n.2, p.67-70, jun. 1973
- KATARIA, H.R.; GROVER, R.K. Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping-off of mung bean (*Phaseolus aureausi*). *Annals of Applied Biology*, New York, v.88, p.257-263, mar. 1978.
- 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. cap.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. (eds) *The biology of Botrytis*. New York: Academic Press, 1980. Cap.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. Viçosa: UFV, 1996.70 p. (Tese – Mestrado em Fitopatologia).
- MOORMAN, G.W.; LEASE, R.J. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant Disease*, St. Paul, v.76, n.4, p.477-480, apr. 1992.
- PAPPAS, A.C.; FISHER, D.J. A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science*, Oxford, v.10, n.3, p.239-246, mar. 1979.
- PARISI, J.J.D. Sensibilidade *in vitro* de *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* a fungicidas e efeito do tratamento de sementes de soja

- (*Glycine max*) inoculadas com os patógenos. Piracicaba: ESALQ, 1997. 61p. (Tese - Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- POWELSON, R.L. Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, St. Paul, v.50, n.6, p.491-494, July 1960.
- 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, n.4, 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. cap.3, p. 23-44.
- SOUZA, M.G. Etiologia e controle do tombamento de mudas de eucalipto, causado por *Botrytis cinerea*, no estágio de fechamento de canteiros. Viçosa: UFV, 1991. 53p. (Tese - Mestrado).
- STEHMANN, C.; DE WAARD, M.A. Biological activity of triazole fungicides towards *Botrytis cinerea*. In: LYR, H.; RUSSELL, P.E.; SISLER, H.D. (eds) **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. cap. 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 (*Eucalyptus* sp), por fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, vol.22, p.320, ago. 1997. (suplemento).

CAPÍTULO 3

ADAPTABILIDADE *IN VITRO* DE LINHAGENS DE *Botrytis cinerea* RESISTENTES A FUNGICIDAS.

1 RESUMO

KIMURA, Mauro Koozo. Adaptabilidade *in vitro* de linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas. Lavras: UFLA, 1999. 132p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)

A ineficiência no controle de uma doença no campo após aplicação de um produto químico originalmente eficiente, pode ser devido ao surgimento de linhagens resistentes. Este fato poderá ser confirmado através de teste em laboratório. Este trabalho objetivou o estudo *in vitro* do isolado de *Botrytis cinerea* frente a resistência a fungicidas. Obteve-se as linhagens possivelmente resistentes aos fungicidas pelo método de fungicida incorporado ao meio BDA, realizado no Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças Fúngicas, do Departamento de Fitopatologia/UFLA. Estudou-se a adaptabilidade das linhagens pelo crescimento micelial das linhagens em meio BDA, capacidade de esporulação, capacidade de germinação dos conídios e patogenicidade das linhagens obtidas. Estudou-se também a estabilidade das linhagens em meio BDA e a estabilidade das linhagens no meio com os fungicidas. Diante de alguns resultados, avaliou-se a resistência cruzada e dupla resistência das linhagens aos fungicidas benomyl e iprodione. As linhagens proveniente do eucalipto usando os

Comitê Orientador: Paulo Estevão de Souza - UFLA (Orientador), Mário Lúcio Vilela Resende - UFLA, Mário Sobral de Abreu - UFLA, Ricardo Magela de Souza - UFLA.

fungicidas benomyl, tiofanato metílico, iprodione, procymidone e captan usualmente aplicado sobre o isolado em estudo, demonstraram alta adaptabilidade aos fungicidas benomyl, tiofanato metílico e iprodione, e média a baixa adaptabilidade ao procymidone e ao captan. Quando se avaliou o crescimento micelial. Entretanto, todas as linhagens demonstraram menor esporulação que o isolado original e a capacidade de germinação foram quase igual para todos. Com exceção da linhagem proveniente do captan, as demais demonstraram estabilidade no crescimento micelial e patogenicidade em plântulas de eucalipto, após 10 sucessivas repicagens ao meio BDA; e também permaneceram-se com estabilidade do crescimento micelial no meio com fungicidas; com resistência cruzada e dupla resistência entre as linhagens. Para as linhagens proveniente dos fungicidas nunca utilizados para o controle do isolado de *B. cinerea* em estudo, as linhagens proveniente dos fungicidas DMI's (inibidores de reação de demetilação) de modo geral demonstraram adaptabilidade, entretanto não tiveram estabilidade do crescimento micelial no meio BDA e no meio com fungicida, apresentado dupla resistência ao benomyl e não apresentado dupla resistência ao iprodione, e para outras linhagens, ocorreu grande variação na adaptabilidade e estabilidade da resistência. Conclui-se que o isolado de *B. cinerea* em estudo, demonstrou resistência aos fungicidas benomyl e tiofanato metílico, e baixa resistência aos fungicidas iprodione, procymidone e captan, com grande adaptabilidade aos fungicidas benomyl e tiofanato metílico. Para os demais fungicidas avaliados, o isolado demonstrou adquirir resistência aos fungicidas, sendo de grande importância este estudo na implementação da estratégia de controle de *B. cinerea*.

2 ABSTRACT

KIMURA, Mauro Koozo. In vitro adaptability of strains of *Botrytis cinerea* resistant to fungicides. Lavras: UFLA, 1999. 132p. (Dissertation - Master in Phytopathology)

The inefficient to control a disease in the field after application of an originally efficient chemical may be due appearance of fungicide resistant strains. a fact that will be able to be confirmed through a laboratory test. This work was designed to study *in vitro* the isolate of *Botrytis cinerea* in view of fungicides resistance. The possibly fungicides resistance strains were obtained by the method of fungicide incorporated into PDA culture medium, accomplished at the Epidemiology and Fungal Disease Management Laboratory, of the Phytopathology Department/UFLA. The adaptability of the strains was studied, by the mycelial growth of the strain in PDA medium, sporulation capacity and spore germinating capacity and pathogenicity of the strains obtained. Other parameter studied was the stability of the strains in PDA culture medium and the stability of the strains in the medium with the fungicides. In face of some results, the cross resistance and double resistance of the strains to the fungicidal benomyl and iprodione were studied. In general, to the strains coming from the fungicidal benomyl, thiophanate-methyl, iprodione, procymidone and captan, usually applied on the isolate under study showed high adaptability to the fungicides benomyl and thiophanate-methyl and iprodione, and medium to low adaptability to procymidone and the captan. When evaluating the mycelial growth, however all strains showed less sporulation than the original isolate and germination capacity

Guidance Committee: Paulo Estevão de Souza - UFLA (Adviser), Mário Lúcio Vilela Resende - UFLA, Mário Sobral de Abreu - UFLA, Ricardo Magela de Souza - UFLA.

was almost equal for all with exception of the strain coming from captan, the others showed stability in the mycelial growth and pathogenicity in eucalyptus seedling, after 10 successive transplanting in the PDA medium and also remained with stability of the mycelial growth in the medium with fungicides; with cross resistance and double resistance among the strains. For the strains coming from the fungicides never utilized for the control of the *B. cinerea* isolate under study, the strains coming from the DMI's fungicides (demethylation reaction inhibitors), in general showed adaptability, however, they didn't have the stability of the mycelial growth in the PDA medium and in the medium with fungicide presenting double resistance to benomyl and not presented double resistance to the iprodione and for other strains occurred a great variation in the stability and adaptability of resistance. It follows that the isolate of *B. cinerea* under study, showed resistance to the fungicidal benomyl and thiophanate-methyl and low resistance to the fungicides iprodione, procymidone and captan, with great adaptability to the fungicides benomyl and thiophanate-methyl. To the other fungicides evaluated, the isolated showed to acquire resistance to the fungicides, this study being of great importance in the implementation of the strategy of control of *B. cinerea*.

3 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de populações de fungos resistentes a fungicidas pode ocasionar perdas tanto para o usuário, o qual pode perder toda sua produção por falta da eficiência do fungicida, quanto para o fabricante do produto, o qual investiu alto na descoberta e no desenvolvimento do fungicida. É importante, portanto, que essas novas e poderosas armas do arsenal químico sejam utilizadas com as estratégias certas para diminuir esses riscos.

Os fungos, como todos os organismos vivos, são geneticamente maleáveis e podem, através de mutações, tornar-se resistentes a fungicidas específicos que atuam em um ou em poucos processos metabólicos vitais. O aparecimento de organismos resistentes aos fungicidas inespecíficos é mais difícil, pois necessitaria que o fungo passasse por muitos processos de mutação, em várias partes do genoma. Até 1970, devido à predominância de fungicidas inespecíficos, os casos de resistência relatados no campo limitavam-se a menos de 10 gêneros de fungos. Em contraposição, coincidindo com a escalada dos fungicidas sistêmicos, esse número já era de aproximadamente 60 gêneros em 1988, contando também com aqueles com múltipla resistência (Delp, 1994).

Estima-se que células fúngicas mutantes, espontâneas ou induzidas, resistentes a fungicidas sistêmicos, surgem numa proporção de 1 em 10^4 a 1 em 10^9 . Ainda que, em condições de laboratório, consigam-se mutantes resistentes de todos os fungos a todos os fungicidas sistêmicos testados, são necessários mais dois fatores para que o problema estenda-se ao campo: a adaptabilidade do mutante e a pressão de seleção. Quando detecta-se a falha de controle no campo, após aplicação de um produto químico originalmente eficiente, pode-se estar frente a uma nova linhagem resistentes ao fungicida, fato este que poderá ser

confirmado por meio de teste em laboratório e casa-de-vegetação, tais como testes de adaptabilidade de linhagens resistentes, que podem fornecer dados referente à patogenicidade e habilidade competitiva da nova linhagem e fornecem subsídios para a previsão de prováveis consequências que poderão advir da expansão da população resistente no campo.

A adaptabilidade do mutante depende, fundamentalmente, do gene ou genes que sofreram mutação para resistência. Se esses genes, antes da mutação, eram importantes condicionadores de competitividade (por exemplo, patogenicidade, capacidade de esporulação e sobrevivência), então o mutante terá baixa adaptabilidade; caso contrário, continuará com sua adaptabilidade inalterada.

Essa adaptabilidade do mutante tem estreita relação com a forma de ação do fungicida, sendo que os mutantes bem adaptados surgem com mais facilidade face a determinados princípios ativos. Segundo Dekker (1982), citado por Kimati (1995), há indicações, ainda grosseiras, de que com fungicidas como as acylalaninas (metalaxyl), os benzimidazóis (benomyl, carbendazim, thiabendazole e tiofanato metílico) apresentam alto risco de falhas, ao passo dos triazóis (triadimenol, tebuconazole, bitertanol, difenoconazole, propiconazole, cyproconazole, etc.), imidazóis (imazalil) e as morfolinás (tridemorph, dimethomorph, etc.) apresentam baixo risco.

Uma alta adaptabilidade dos mutantes não significa, obrigatoriamente, problema de resistência no campo; nem uma baixa adaptabilidade significa ausência de riscos de resistência. Mesmo um fungicida pouco vulnerável estará, sob condições de alta pressão de seleção, correndo riscos de aumentar as chances de mutações que originam tipos cada vez mais adaptados de mutantes resistentes. Assim, o surgimento de problemas de resistência a fungicidas no campo depende,

em grande parte, da pressão de seleção exercida pela inadequada aplicação de fungicidas.

Diante desses fatos e dada a importância dos fungicidas, realizaram-se trabalhos com o objetivo de estudar a adaptabilidade do isolado e das linhagens de *B. cinerea* resistentes aos fungicidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção *in vitro* de linhagens resistentes a fungicidas

A partir de isolado de *Botrytis cinerea*, obtiveram-se, em condições de laboratório, linhagens possivelmente resistentes. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças Fúngicas, do Departamento de Fitopatologia/UFLA. O isolado foi incubado por 7 dias, sob temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas; em seguida, discos de BDA de 7 mm de diâmetro, contendo micélio do isolado, foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA acrescido dos fungicidas nas concentrações de: 1000 ppm de azoxytrobin, benomyl, iprodione, captan, tiofanato metílico, dodine; 100 ppm de procymidone e triforime; 10 ppm de tolilfluaniid; 1 ppm de triadimenol, tebuconazole, difenoconazole, propiconazole e cyproconazole, em seguida, as placas foram incubadas nas mesmas condições ambientais acima descritas, durante 7 a 10 dias. As linhagens obtidas foram posteriormente transferidas para novas placas com BDA sem fungicida, e incubadas novamente por 7 dias. Em seguida, para confirmar a resistência dos isolados aos fungicidas, os isolados obtidos foram repicados em meio BDA contendo os fungicidas nas concentração de 100 ppm.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 14 tratamentos e 4 repetições, sendo cada parcela constituída de uma placa, e mais a testemunha sem fungicida.

Considerou-se, como linhagens resistentes ou insensíveis, aquelas quais cresceram no meio contendo os fungicidas após dois cultivos. As linhagens que cresceram somente no primeiro cultivado, nos meios com os fungicidas, foram consideradas como possíveis linhagens resistentes.

4.2 Adaptabilidade avaliado pelo crescimento micelial

Para avaliar o crescimento micelial das linhagens de *B. cinerea* resistentes aos fungicidas, discos miceliais provenientes do meio BDA, mais os fungicidas, foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados, como descrito em 4.1., durante 5 dias. Em seguida, discos de BDA contendo micélio das linhagens foram transferidas para o centro das placas de Petri contendo BDA e incubadas durante 7 dias, sob as mesmas condições já citadas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 19 tratamentos e 4 repetições, sendo cada parcela constituída de 1 placa.

Avaliou-se diariamente, durante 7 dias, o crescimento micelial, medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos, na sua perpendicular, usando uma régua graduada em milímetro, obtendo-se o índice de crescimento micelial (ICM), calculado pela seguinte fórmula $ICM = \sum(L_n - L_{n-1})/n$, onde:

L_n : 1ª leitura ... 7ª leitura

Todas as linhagens obtidas foram submetidas à análise de variância separadamente com a testemunha, e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

4.3 Adaptabilidade avaliada pela esporulação

Comparou-se a produção de esporos entre as linhagens obtidas e o isolado original de *B. cinerea*. Discos de 7 mm de BDA contendo micélio das linhagens, foram transferidos para meio de BDA e incubados durante 15 dias sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, para indução da esporulação. Após o período de incubação, quantificaram os esporos dos diferentes tratamentos; para isto, 10 ml de água destilada, mais uma gota de Tween 20 (Polyoxetileno mono-oleato de sorbitan), foram colocadas sobre as placas com a colônia, e com uma lâmina de aço inox o crescimento micelial foi

superficialmente raspado, obtendo-se densa suspensão fúngica. A suspensão diluída foi filtrada em camada dupla de gase, obtendo-se, assim, uma suspensão conidial. Com o auxílio de pipeta, uma gota da suspensão foi depositada em hemacitômetro, realizando-se a contagem dos esporos em microscópio estereoscópico.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 19 tratamentos e 4 repetições, sendo cada repetição constituída pela média de duas leituras. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4 Capacidade de germinação dos conídios

Comparou-se a capacidade de germinação conidial entre as linhagens obtidas e o isolado original de *B. cinerea*.

Após a quantificação dos esporos produzidos por cada linhagem, uma quantidade de 50 μ l da suspensão conidial foi transferida para lâminas, que foram colocadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo papel de filtro previamente umedecidos com água. Em seguida, as placas foram incubadas por 16 horas no escuro e em temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 19 tratamentos e 4 repetições e cada repetição foi constituída por uma lâmina escavada e uma leitura.

Após o período de incubação, quantificaram os esporos que germinaram em microscópio estereoscópico com aumento de 40 vezes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.5 Estabilidade da resistência das linhagens em meio BDA

Para avaliar a estabilidade da resistência, realizaram transferências sucessivas das linhagens de *B. cinerea* resistentes aos fungicidas: (DTF, DTB, -DDF, DPP, DTD, UBN, UTF, UPC, UIP, UCP, NTL, NDD, NAZ, NDM, NDT e NCH) em meio de BDA isento de fungicida.

Discos de 7 mm de diâmetro contendo micélio das diferentes linhagens, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de BDA, e incubados por 7 dias em câmara de crescimento, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. A partir do período de incubação, foram realizadas transferências sucessivas de discos micelial, em meio BDA, a cada três dias de incubação, realizando-se dez transferências sucessivas das linhagens, sendo as placas incubadas sob as mesmas condições do ítem 1.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, utilizando 17 linhagens em 10 repetições (uma repetição = uma transferência), sendo uma placa por repetição.

Após 3 dias de incubação, avaliou-se o crescimento micelial, medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos, na sua perpendicular, usando uma régua graduada em milímetro. Todas as linhagens obtidas foram submetidas à análise de variância, separadamente com a testemunha, e as médias comparadas pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

4.6 Patogenicidade das linhagens

Avaliou-se a capacidade patogênica das linhagens resistentes de *B. cinerea* inoculando-se plântulas de eucalipto com micélio das linhagens obtidas a partir da 1ª, 5ª e 10ª repicagem do ensaio de estabilidade da resistência.

Para a formação das plântulas de eucalipto, foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis*, semeadas em tubetes apropriados, contendo substrato

Plantmax. Plântulas com 1-2 pares de folhas, com aproximadamente 60 dias após a semeadura, foram aclimatadas por 2 dias, em câmara climatizadora, a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as plântulas foram inoculadas, por contato micelial, utilizando-se culturas das linhagens de *B. cinerea*, mantidas por 5 dias no meio BDA. A inoculação foi feita por meio de contato de disco micelial de 3 mm de diâmetro, com a haste principal das plântulas colocada logo abaixo do primeiro par de folhas, e mantida por 5 dias em câmara úmida.

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizado com 42 tratamentos em 5 repetições, sendo um tubete por repetição, em que a unidade experimental constou de uma planta/tubete.

Procedeu-se a avaliação das plântulas, após 3 dias da retirada da câmara úmida, contando o número de plântulas com sintoma do mofo cinzento. A linhagem que causou sintomas da doença nas plântulas foi considerada como linhagem patogênica, e aquela que não causou sintomas nas plântulas, considerada como não patogênica.

4.7 Estabilidade da resistência das linhagens em meio com fungicidas

A estabilidade das linhagens resistentes aos fungicidas foi avaliada por sucessivas transferências de discos miceliais destas linhagens aos seus respectivos fungicidas. As linhagens foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubadas por cinco dias, a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após o período de incubação, discos miceliais foram retirados das bordas das colônias e transferidos para placas de Petri contendo BDA mais o fungicida, na concentração de 100 ppm, previamente preparado pelo método incorporado do fungicida ao meio BDA. As transferências miceliais foram realizadas a cada 3

dias de incubação, durante 7 gerações. As placas foram incubadas a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, utilizando-se 13 fungicidas (azoxystrobin, triforine, captan, triadimenol, iprodione, propiconazole, difenoconazole, dodine, procymidone, tolilfluanid, benomyl, tebuconazole e tiofanato metílico) e mais a testemunha sem fungicida, em 2 repetições, sendo cada repetição um disco micelial avaliado.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos, na sua perpendicular, usando uma régua graduada em milímetro. Todas as linhagens obtidas foram submetidas à análise de variância separadamente com a testemunha, e as médias comparadas pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

4.8 Resistência cruzada e a dupla resistência das linhagens obtidas, aos fungicidas benomyl e iprodione

Para avaliar a resistência cruzada e a dupla resistência aos fungicidas benomyl e iprodione, todas as linhagens resistentes aos fungicidas obtidos *in vitro* foram testadas.

Os fungicidas foram incorporados ao meio de cultura BDA fundente a uma temperatura de $45-50^{\circ}\text{C}$, obtendo-se uma concentração de 100 ppm. Após a homogeneização do meio, este foi vertido para placas de Petri de 9 cm de diâmetro e logo após a solidificação do meio, dois discos de 7 mm de diâmetro, contendo micélio das linhagens resistentes, foram colocados em lados opostos das placas. A incubação foi feita em câmara de crescimento com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 8 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando 18 linhagens resistentes em duas repetições, sendo cada parcela constituída de um disco micelial.

As avaliações foram realizadas ao 4º e 8º dia de incubação, pela medição do diâmetro das colônias. As linhagens que se desenvolveram no meio iprodione ou benomyl foram consideradas aptas a adquirir a dupla resistência ou resistência cruzada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das linhagens resistentes aos fungicidas

Os resultados da obtenção de linhagens resistentes de *B. cinerea* a fungicidas podem ser observados na Tabela 1.

Verifica-se que o isolado de *B. cinerea* em estudo demonstrou produzir linhagens potencialmente com resistência aos fungicidas. Houve desenvolvimento no meio BDA acrescido de 1000 ppm de azoxystrobin, benomyl, iprodione, captan, tiofanato metílico, dodine, chlorotalonil, fopet, quintozene, dimethomorph, dithianon, imibenconazole; 100 ppm de procymidone e triforine; 10 ppm de tolifluanid; 1 ppm de triadimenol, tebuconazole, difenoconazole, propiconazole e cyproconazole, apresentando crescimento micelial sobre os fungicidas incorporado ao meio. As linhagens que se desenvolveram no meio com os fungicidas foram repicadas para o meio BDA e consideradas como linhagens provavelmente resistentes, obtidas *in vitro*, e utilizadas nos demais ensaios.

Das linhagens obtidas dos fungicidas inibidores da reação de demetilação (DMI's) que cresceram no meio com 1 ppm do fungicida, quando foram repicados para o meio contendo 100 ppm do mesmo fungicida, somente a linhagem DDF demonstrou desenvolvimento micelial, confirmando que esta pode ter adquirido resistência ao fungicida difenoconazole. As demais linhagens que cresceram a 1 ppm no meio com os fungicidas do grupo dos DMI's e não se desenvolveram quando repicadas para o meio com 100 ppm podem, não ter adquirido a resistência a 1 ppm, com a exceção da linhagem DCP, que não foi avaliada. A linhagem DTF, que foi obtida a 100 ppm, também não se desenvolveu quando foi novamente colocada para crescer em 100 ppm de triforine. A única linhagem do grupo dos DMI's que cresceu em 1000 ppm foi a

linhagem DIM, porém este isolado não foi repicado para o meio com 100 ppm do fungicida. Essa variação da resistência do isolado aos fungicidas do grupo SBI's (inibidores da biosíntese de esteróis) pode estar relacionado ao modo de ação dos fungicidas e a localização do radical químico da molécula básica de 1,2,4-triazol, que dá origem ao fungicida. Apesar deste grupo agir na rota metabólico da formação do ergosterol, ou seja, entre a 1^a e a 2^a reação, correspondendo entre a passagem do lanosterol e o 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trienol (Forcelini, 1994), provavelmente, a origem da molécula química determina a eficácia da fungitoxicidade e a estabilidade da molécula, diante do fungo. De acordo com Scheinpflug (1994), nenhuma ocorrência natural da resistência de organismos, foi verificada após os primeiros anos de uso dos fungicidas DMI's na agricultura. Isto sugere a facilidade de induzir artificialmente linhagens resistentes em laboratórios, demonstrando inicialmente baixo nível de resistência e instabilidade do fungo resistente, devido à obtenção de algumas linhagens resistente e outras não resistentes .

Observa-se que o isolado de *B. cinerea*, proveniente de local que recebeu intensivas aplicações dos fungicidas captan, benomyl, tiofanato metílico, iprodione e procymidone, desenvolveu crescimento micelial, demonstrado que pode ter adquirido resistência a esses fungicidas. Contudo, somente no meio com fungicida protetor captan, o isolado não foi capaz de desenvolver o crescimento micelial. Porém, quando todas as linhagens obtidas a 1000 ppm foram repicado para o meio com 100 ppm do fungicida, todas as linhagens desenvolveram crescimento micelial, com exceção da linhagem UCP. Os dados demonstraram que essas linhagens apresentaram resistência cruzada entre os fungicidas do grupo dos benzimidazoles (benomyl x tiofanato metílico) e ao grupos dos dicarboximidias (iprodione x procymidone) e dupla resistência aos grupos dos benzimidazoles x dicarboximidias, fato este relatado por Smith (1994), Schuepp e

Lauber (1977); Staub e Diriwaechter (1986), segundo os quais a resistência ao benomyl ocorreu após dois anos de uso no controle do mofo cinzento em videira, em que eram áreas de alta pressão da doença e de intensivo uso do fungicida. O número de linhagens com resistência cruzada e duplo resistente aumentam rapidamente com o uso intensivo em alternância com benomyl (Pommer e Lorenz, 1987). Observa-se também, que o isolado em estudo ainda não adquiriu, provavelmente resistência ao fungicida captan, do grupos das ftalimidas, pois este necessitaria modificações em vários sítios de ação para desencadear o processo de resistência do fungo ao fungicida (Köller e Scheinpflug, 1987).

Algumas linhagens podem ter adquirido resistência ao benomyl, tiofanato metílico, iprodione, procymidone, sendo provável que o isolado em estudo, por ter sofrido pressão de seleção por estes fungicidas, tenha adquirido dupla resistência a estes fungicidas; o mesmo resultado foi encontrado por Moorman e Lease (1992).

Observou-se que o isolado em estudo apresentou insensibilidade aos fungicidas que nunca foram aplicados sobre a área, apresentando crescimento micelial no meio fungicida com 1000 ppm. Esta insensibilidade pode estar relacionada ao modo de ação do fungicida captan intensivamente aplicado, que é semelhante ao modo de ação de alguns fungicidas, como o folpet, thiran, chlorotalonil e dichlofluanid (Rewal, Coley-Smith e Sealy-Lewis, 1991), com exceção do fungicida tolilfluanid, no qual o fungo se desenvolveu na concentração de 10 ppm, diferente do resultado encontrado por Malathrakis (1989), o qual constatou isolado de *B. cinerea* resistente ao dichlofluanid (similar ao tolilfluanid), na concentração de 81 ppm, quando avaliou o crescimento micelial. Das três linhagens repicadas para o meio com 100 ppm dos fungicidas, apenas a linhagem NTF não foi capaz de desenvolver o crescimento micelial no meio com tolilfluanid, demonstrando que o isolado em estudo ainda não esteve em contato

TABELA 1 - Crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, para obtenção de isolados possivelmente resistentes aos fungicidas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Fungicidas	Grupo Químico	Linhagens ¹⁾	Obtenção das linhagens			
			1 ^a (ppm)	Diâmetro (mm)	2 ^a 2 ¹ (ppm)	Diâmetro (mm)
Cyproconazole	DMI (não aplicado)	DCP	1	45.63	---	---
Difenoconazole	DMI (não aplicado)	DDF	1	48.25	100	32.00
Imibenconazole	DMI (não aplicado)	DIM	1000	18.38	---	---
Propiconazole	DMI (não aplicado)	DPP	1	23.88	100	0
Tebuconazole	DMI (não aplicado)	DTB	1	22.50	100	0
Triadimenol	DMI (não aplicado)	DTD	1	75.25	100	0
Triforine	DMI (não aplicado)	DTF	100	83.00	100	0
Benomyl	Benzimidazóis (aplicado)	UBN	1000	27.75	100	37.00
Captan	Ftalimidas (aplicado)	UCP	1000	14.25	100	0
Iprodione	Dicarboximidas (aplicado)	UIP	1000	19.38	100	26.00
Procymidone	Dicarboximidas (aplicado)	UPC	100	22.75	100	48.50
Tiofanato metílico	Benzimidazóis (aplicado)	UTM	1000	64.0	100	39.36
Azoxystrobin	Estrobirulinas (não aplicado)	NAZ	1000	56.13	100	23.76
Chlorotalonil	Comp. Aromáticos (não aplicado)	NCH	1000	13.88	---	---
Dimethomorph	Morfolinas (não aplicado)	NDM	1000	57.88	---	---
Dithianon	Antraquinonas (não aplicado)	NDN	1000	29.38	---	---
Dodine	Guanidinas (não aplicado)	NDD	1000	10.63	100	10.26
Folpet	Ftalimidas (não aplicado)	NFP	1000	10.38	---	---
Quintozene	Nitrobenzenos (não aplicado)	NQZ	1000	25.50	---	---
Tolilfluânid	Der. de Anilinas (não aplicado)	NTF	10	3.13	100	0
Testemunha	-	TES	---	83.0	---	83.00

--- não testado 1) distinção da procedência das linhagens, sendo a primeira letra: D (grupo dos DMI's), U (fungicida frequentemente aplicado na área) e N (fungicida nunca aplicado na área). 2) repicagem da linhagem obtida

com tolilfluaniid. E para as linhagens NDD e NAZ, o isolado cresceu no meio com 100 ppm dos fungicidas dodine e azoxystrobin, respectivamente, apresentando insensibilidade natural a estes fungicidas. Provavelmente, esses fungicidas não apresentam modo de ação capaz de inibir importante rota metabólica vital do fungo.

5.2 Adaptabilidade avaliado pelo crescimento micelial das linhagens

Os resultados da adaptabilidade pelo crescimento micelial das linhagens resistentes de *B. cinerea* a fungicidas podem ser observados na Figura 1. Observa-se que a maioria das linhagens apresentaram maiores índices de crescimento micelial, porém mantendo a mesma tendência do crescimento da testemunha, após o período de incubação.

Dentre as linhagens obtidas dos fungicidas do grupo dos DMI's, as linhagens DTC (A), DDF (C), DTF (D), DPP (E) e DTD (F) apresentaram índice de crescimento micelial superior à testemunha no período inicial da incubação, distinguindo estatisticamente da testemunha, entretanto, após 7 dias de incubação, a tendência do crescimento micelial igualou-se ao da testemunha. A linhagem DCP (B) se desenvolveu na mesma proporção da testemunha, tendo o diâmetro médio final do crescimento micelial e o índice de crescimento estatisticamente igual à testemunha, mantendo a mesma tendência do crescimento micelial. Dessa maneira, as características das linhagens provenientes dos fungicidas do grupo dos DMI's demonstraram que as linhagens podem ser tão ou mais adaptadas que o isolado sensível, podendo, assim, apresentar capacidade de predominar e permanecer na população do patógeno quando sofrerem a pressão de seleção pelos fungicidas DMI's.

Para as linhagens UBN (H), UIP (G) e UTM (L) cresceram com maior intensidade que a testemunha, com maiores índice de crescimento e também com

maior diâmetro médio do crescimento micelial após o período de incubação, mas mantendo a mesma tendência de crescimento micelial. Resultados semelhantes foram encontrados por Ghini (1987) com isolados resistentes de *Botrytis squamosa* a benzimidazóis, demonstrando que linhagens resistentes ao benomyl podem ser tão ou mais adaptadas do que as sensíveis, conferindo-lhes, assim, a capacidade de predominar e permanecer na população do patógeno. Dennis e Davis (1979) conseguiram isolar linhagens de *B. cinerea* provenientes de plantações de morango e verificaram que estas linhagens eram capazes de crescer em meio de cultura contendo até 10000 ppm de iprodione e 1000 de vinclozolin. A linhagem UPC (J) cresceu estatisticamente com menos intensidade que a testemunha, com índice de crescimento micelial e o diâmetro final do crescimento micelial inferior; porém, após período de incubação, mostrou-se na mesma tendência do crescimento da testemunha. Apesar de procymidone apresentar modo de ação semelhante ao iprodione, a diferença do crescimento micelial entre as linhagens provenientes de procymidone e iprodione pode indicar um diferencial no modo de ação entre estes dois fungicidas. Pappas e Fisher (1979), quando não conseguiram determinar o modo de ação primário dos fungicidas iprodione, procymidone e vinclozolin, citam haver diferentes mecanismos de ação entre os dicarboximidas. A linhagem UCP (I) cresceu na mesma tendência da testemunha, obtendo índice de crescimento micelial e o diâmetro do crescimento micelial final estatisticamente proporcional à testemunha. Este resultado demonstra que, após sucessivas aplicações do captan, a ocorrência de linhagem resistente a fungicidas convencionais pode se adaptar e competir com o isolado selvagem.

Para as linhagens NCH (R) e NDD (P), os isolados tiveram um baixo índice de crescimento micelial e menor diâmetro do crescimento micelial final, não seguindo a tendência de crescimento, quando comparados com a testemunha. Provavelmente, chlorotalonil e dodine apresentam vários mecanismos de ação que

prejudicam alguma rota metabólica vital de *B. cinerea*. E de fato as linhagens NCH (R) e NDD (P) foram afetadas em alguma rota metabólica que codifica a capacidade de crescimento micelial. As linhagens NAZ (N), NQZ (M), NDM (O) e NDN (Q) apresentaram desenvolvimento superior ao da testemunha, em índice de crescimento micelial e diâmetro final do crescimento micelial, entretanto, mantendo a mesma tendência de crescimento da testemunha. Pode-se observar que azoxystrobin, quintozene, dimethomorph e dithianon não apresentam mecanismos de ação capazes de afetar importante rota metabólica de *B. cinerea*. A linhagem NTF (proveniente do tolilfluanid), após a repicagem do disco micelial para as placas de Petri, praticamente não se desenvolveu durante o período de incubação. O surgimento de linhagens resistentes em testes *in vitro* não implica que o uso destes produtos no campo resultará em falha do controle da doença, sendo que a resistência depende da adaptabilidade da linhagem resistente e da pressão de seleção (Dekker, 1982). Neste caso, pode-se observar que os fungicidas tolilfluanid, dodine e chlorotalonil não foram capazes de manter o mesmo crescimento da testemunha, perdendo a sua habilidade competitiva. O isolado demonstrou ser insensível aos fungicidas azoxystrobin, quintozene, dimethomorph e dithianon, sendo que estes fungicidas não interferiram na habilidade do crescimento micelial do mesmo.

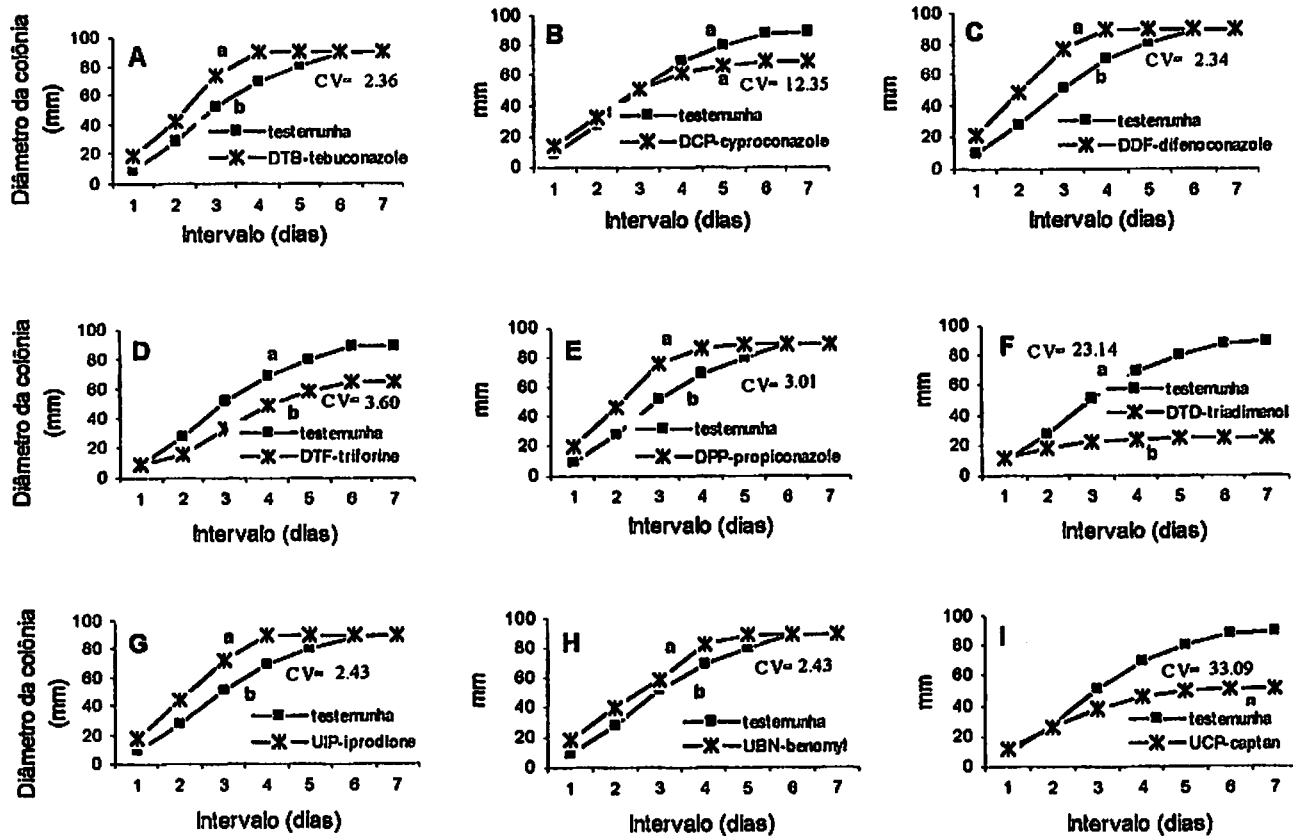
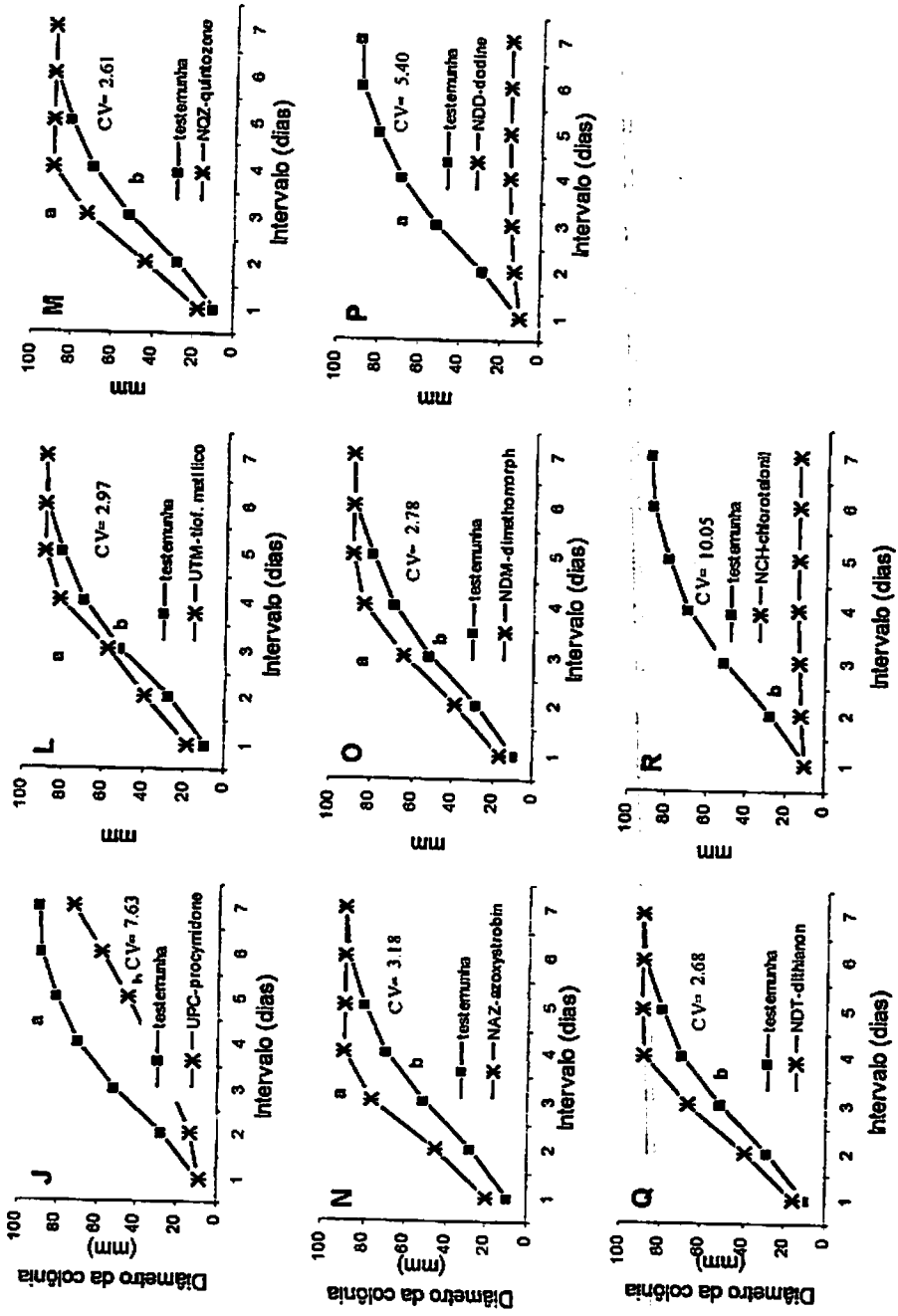


FIGURA 1 - Evolução do crescimento micelial de linhagens resistente a fungicidas e do isolado de *Botrytis cinerea*. Média seguida por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

FIGURA I, Cont.



5.3 Adaptabilidade avaliada pela esporulação e capacidade de germinação das linhagens

Os resultados da adaptabilidade pela esporulação e capacidade de germinação das linhagens resistentes de *B. cinerea* a fungicidas podem ser observados na Tabela 2. Fato semelhante foi encontrado por Alves (1990) quando estudou a esporulação de *Alternaria porri*, resistente a iprodione, e por Davis e Dennis (1981) e Hisada et al. (1981) quando trabalharam com populações resistentes de *B. cinerea* a dicarboximida.

As linhagens que mais esporularam foram aquelas provenientes dos fungicidas propiconazole, seguidos por triadimenol e por azoxystrobin e triforine. Os demais isolados apresentaram baixa esporulação quando comparados com a testemunha. As linhagens que sofreram pressão de seleção pelos fungicidas benomyl, captan, procymidone, iprodione e tiofanato metílico não mantiveram a mesma esporulação do isolado TES, ou seja, a sua capacidade de reprodução foi retardada. De acordo com Moorman e Lease (1992), os isolados resistentes aos fungicidas do grupo das dicarboximidas tendem a esporular menos do que os isolados sensíveis. Entretanto, quando se avaliou a viabilidade da germinação dos conídios, alto índice de germinação foi obtidos, com valores acima de 60% de germinação (Tabela 2). Davis e Dennis (1981) obtiveram mais de 95% de germinação de conídios após 15 horas de incubação de linhagens resistentes a iprodione e vinclozolin. Houve linhagens que tiveram índices de germinação significativamente mais altos que o isolado TES. As linhagens NTF e NCH não apresentaram índice de germinação, pois não foram capazes de esporular após 20 dias de incubação.

TABELA 2 - Número de conídios e capacidade percentual da germinação conidial das linhagens resistentes de *Botrytis cinerea*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Linhagens	Nº de conídios/ml ¹		% de germinação	
*DCP (cyproconazole)	4,0 ²¹	a ³¹	99,5 ²	d
DDF (difenoconazole)	43,3	d	86,75	c
DPP (propiconazole)	228,0	h	78,5	b
DTB (tebuconazole)	0,25	a	90,0	c
DTD (triadimenol)	197,0	g	89,0	c
DTF (triforine)	92,5	f	87,0	c
UBN (benomyl)	8,75	b	100,0	d
UCP (captan)	70,55	e	0,0	a
UIP (iprodione)	5,5	a	87,0	c
UPC (procymidone)	1,5	a	100,0	d
UTM (tiof. metílico)	15,8	c	92,0	c
NAZ (azoxystrobin)	104,0	f	78,0	b
NCH (chlorotalonil)	0,0	a	0,0	a
NDM (dimethomorph)	1,5	a	74,5	b
NDT (dithianon)	9,75	b	3,0	a
NDD (dodine)	51,3	d	77,5	b
NFP (folpan)	—	—	—	—
NQZ (quintozene)	17,8	c	78,5	b
NTF (tolilfluaniid)	0,0	a	0,0	a
TES (testemunha)	384,0	i	79,5	b

* distinção da procedência das linhagens, sendo a primeira letra: D (grupo dos DMI's), U (fungicida frequentemente aplicado na área) e N (fungicida ainda não aplicado na área).

1\ Número de conídios x 10⁴.

2\ Média de dados originais.

3\ Média seguido pelo mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

5.4 Patogenicidade

Os resultados da patogenicidade das linhagens de *B. cinerea* resistentes a fungicidas podem ser observados na Tabela 3. De um modo geral, todas as

TABELA 3 - Patogenicidade das linhagens resistentes de *Botrytis cinerea*, inoculadas em plântulas de eucalipto. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Linhagens	1ª repicagem ^{1/}	5ª repicagem	10ª repicagem
*DCP (cyproconazole)	+ ^{2/}	---	---
DDF (difenoconazole)	+	+	---
DPP (propiconazole)	+	+	+
DTB (tebuconazole)	+	+	---
DTD (triadimenol)	+	---	---
DTF (triforine)	+	---	---
UBN (benomyl)	+	+	+
UCP (captan)	+	---	---
UIP (iprodione)	+	+	+
UPC (procymidone)	+	+	+
UTM (tiof. metílico)	+	+	+
NAZ (azoxystrobin)	+	---	---
NCH (chlorotalonil)	+	+	-
NDM (dimethomorph)	+	+	+
NDT (dithianon)	+	+	+
NDD (dodine)	+	+	-
NFP (folpan)	---	---	---
NQZ (quintozene)	+	+	+
NTF (tolilfluaniid)	+	+	---
TES (testemumha)	+	+	+

* distinção da procedência das linhagens, sendo a primeira letra: D (grupo dos DMI's), U (fungicida frequentemente aplicado na área) e N (fungicida ainda não aplicado na área).

+ - Linhagens patogênicas. - - Linhagens não patogênicas --- não inoculadas

1/ linhagens obtidas do teste de estabilidade das linhagens resistentes

2/ 5 repetições avaliadas

linhagens obtidas demonstraram estabilidade na patogenicidade às plântulas do eucalipto, causando sintomas visíveis do mofo cinzento e/ou tombamento nas mudas, com esporulação do fungo sobre o material vegetal. As linhagens obtidas

da primeira repicagem demonstraram ser patogênicas após inoculadas. As linhagens que se desenvolveram até a quinta repicagem, demonstraram ser patogênicas. Para as linhagens que se desenvolveram até décima repicagem todas mostraram ser patogênicas, com exceção das linhagens NDD e NCH, que não mostraram patogenicidade.

Observa-se que após 10 sucessivas repicagens das linhagens, a maioria das linhagens obtidas diante dos fungicidas usualmente aplicados (benomyl, tiofanato metílico, iprodione, procymidone e captan), apenas a linhagem UCP não demonstrou estabilidade da patogenicidade, e as linhagens UBN, UTM, UIP e UPC demonstraram estabilidade da patogenicidade. Isolados resistentes a benomyl e iprodione foram patogênicos a cotilédones de pepino (Raposo *et al.*, 1996), mesmo antes de aplicação preventivo dos fungicidas. Os resultados da estabilidade da patogenicidade podem indicar a adaptação das linhagens para competir com o isolado selvagem.

Para as linhagens provenientes dos fungicidas ainda não aplicados nessa área, no controle de *B. cinerea*, as linhagens apresentaram estabilidade da patogenicidade, tendo este isolado potencial em adquirir resistência a esses fungicidas, ainda não utilizados no controle do patógeno.

5.5 Estabilidade da resistência das linhagens em meio BDA

Os resultados da avaliação da estabilidade da resistência das linhagens em meio BDA, expressos pelo diâmetro das colônias, podem ser observados na Figura 2.

Verifica-se que a maioria das linhagens originárias do grupo dos fungicidas DMI's desapareceram após sucessivas transferências. As linhagens DTB (R), DDF (Q), DCP (S) e DTF (P) desapareceram após a 7ª, 5ª, 3ª e 2ª repicagem, respectivamente. Somente a linhagem DPP manteve a estabilidade do

crescimento micelial após 10 repicagens. Este fato demonstra que as linhagem obtidas não foram capazes de modificar o gene que confere a habilidade de competitiva (Dekker, 1977; Georgopoulos, 1977); tal fato pode ser explicado pela não mutação do isolado pelos fungicidas aplicados na área e pela não pressão de seleção exercida pelos fungicida DMI's.

As linhagens UBN (C), UIP (J) e UTM (I) mantiveram a estabilidade do crescimento micelial e do diâmetro médio semelhante ao da testemunha, em todas as 10 repicagens. Isolados de *B. cinerea* resistentes a iprodione e vinclozolin permaneceram estáveis após 40 repicagens em meio sem fungicida (Davis e Dennis, 1981). A linhagem UPC (F) manteve estabilidade do crescimento micelial, porém com valores abaixo da testemunha. A linhagem UCP (N) cessou o seu crescimento micelial após a 3ª repicagem, demonstrando ser um isolado não adaptado. As linhagens provenientes dos fungicidas dos grupos dos benzimidazóis e dos dicarboximidas provavelmente adquiriram a habilidade de crescimento micelial, adaptando-se à pressão de seleção exercida pelos fungicidas.

A única linhagem que cessou o seu crescimento micelial foi a NAZ (O), após a 4ª repicagem. As linhagens NCH (L) e NTF (H) mantiveram uma estabilidade no crescimento micelial, porém com diâmetro médio inferior ao da testemunha, tais fungicidas apresentam eficiência contra o fungo *B. cinerea*, porém são fungicidas que agem em múltiplos sítios de ação. As linhagens NDM (A), NDT (B), NQZ (D) e NDD (G) mantiveram-se com a mesma proporção do diâmetro médio e da estabilidade do crescimento micelial, em relação à da testemunha. Neste caso, o isolado demonstrou ser insensível aos fungicidas dimethomorph, dithianon, quintozene e dodine.

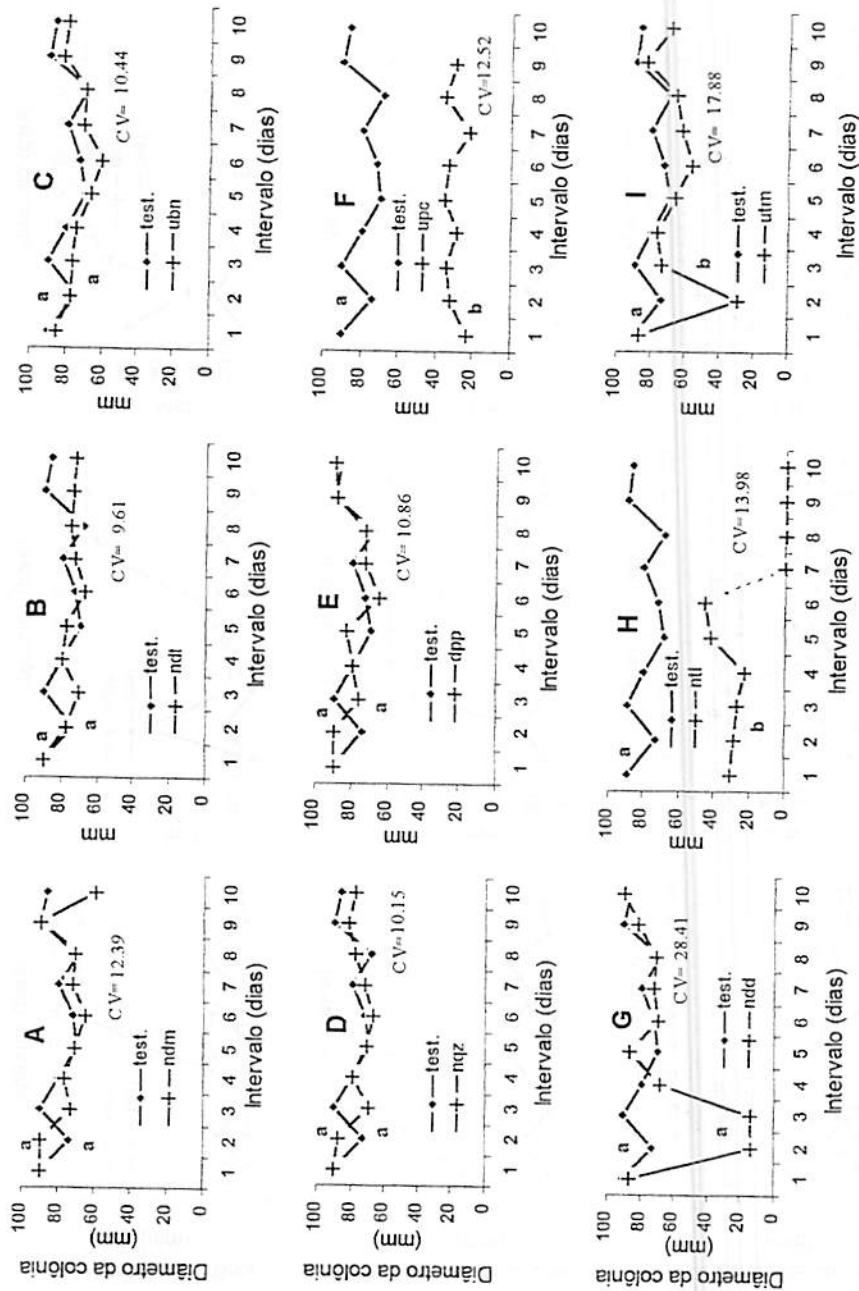
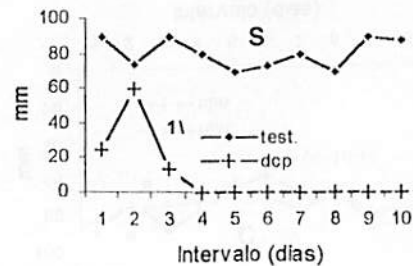
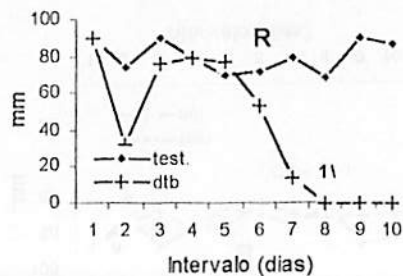
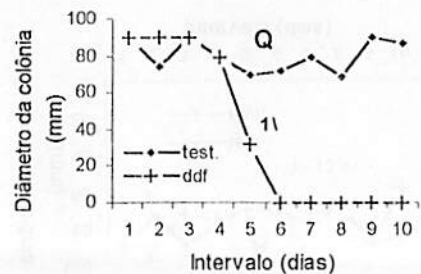
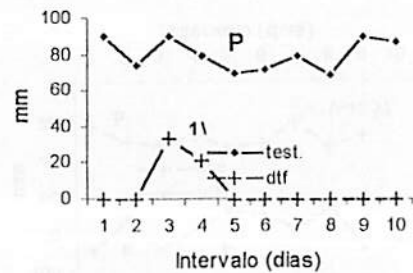
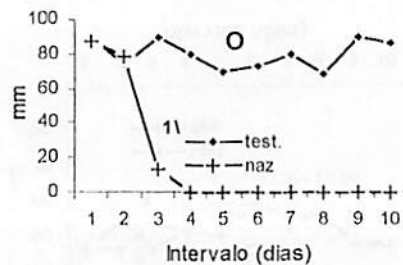
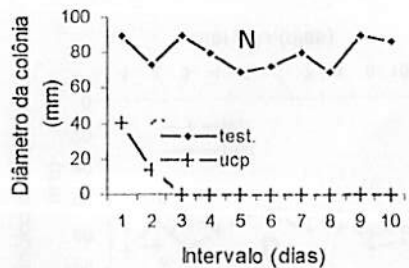
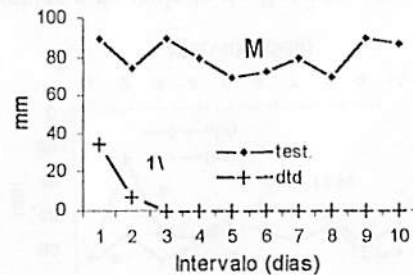
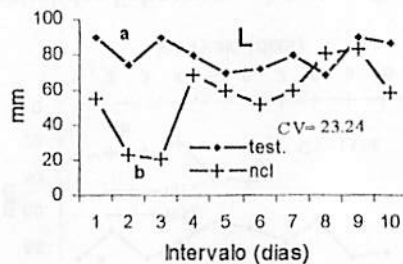
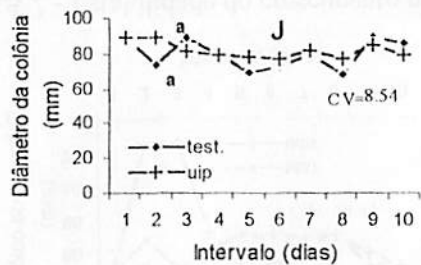


FIGURA 2 - Estabilidade do crescimento micelial das linhagens resistente a fungicidas e do isolado de *Botrytis cinerea* em meio BDA. Média seguida por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

FIGURA 2, Cont.



5.6 Estabilidade da resistência das linhagens em meio com fungicidas

Os resultados da avaliação da estabilidade da resistência das linhagens em meio com fungicidas, expressos pelo diâmetro das colônias, podem ser observados na Figura 3.

Nota-se que entre as linhagens do grupo dos DMI's, as linhagens DDF (F) e DTF (A) mantiveram um crescimento micelial constante após as 7 repicagens sucessivas, porém com raio médio inferior da testemunha. As linhagens DTB, DTD e DPP não se desenvolveram após serem repicadas para o meio com fungicidas. Observa-se que as linhagens não sobreviveram quando expostas à pressão de seleção pelos fungicidas.

Verifica-se que as linhagens UIP (B) e UPC (G) cresceram constantemente durante as 7 repicagens, porém com valores do crescimento micelial inferior da testemunha. As linhagens UBN (D) e UTM (H) cresceram na mesma proporção da testemunha. Somente a linhagem UCP não foi capaz de se desenvolver na presença do fungicida, cessando o crescimento micelial na primeira repicagem. Mesmo expostas ao fungicida, as linhagens UBN (D) e UTM (H) demonstraram adaptabilidade ao crescimento e adquiriram resistência aos fungicidas, também demonstrado por Ghini (1987), em que o isolado de *B. squamosa* resistente a benomyl permaneceu resistente após 5 transferências de culturas monospóricas provenientes do meio fungicida, mantendo a estabilidade na ausência do fungicida.

A linhagem NAZ (E), apesar da baixa eficiência na inibição do crescimento micelial em ensaio *in vitro*, manteve a estabilidade do crescimento micelial, porém abaixo da testemunha. A linhagem NDD (C), também apesar da baixa eficiência na inibição do crescimento micelial em teste *in vitro*, não manteve estabilidade do crescimento micelial, cessando o desenvolvimento a partir da 3ª repicagem. A linhagem NTF não desenvolveu crescimento micelial,

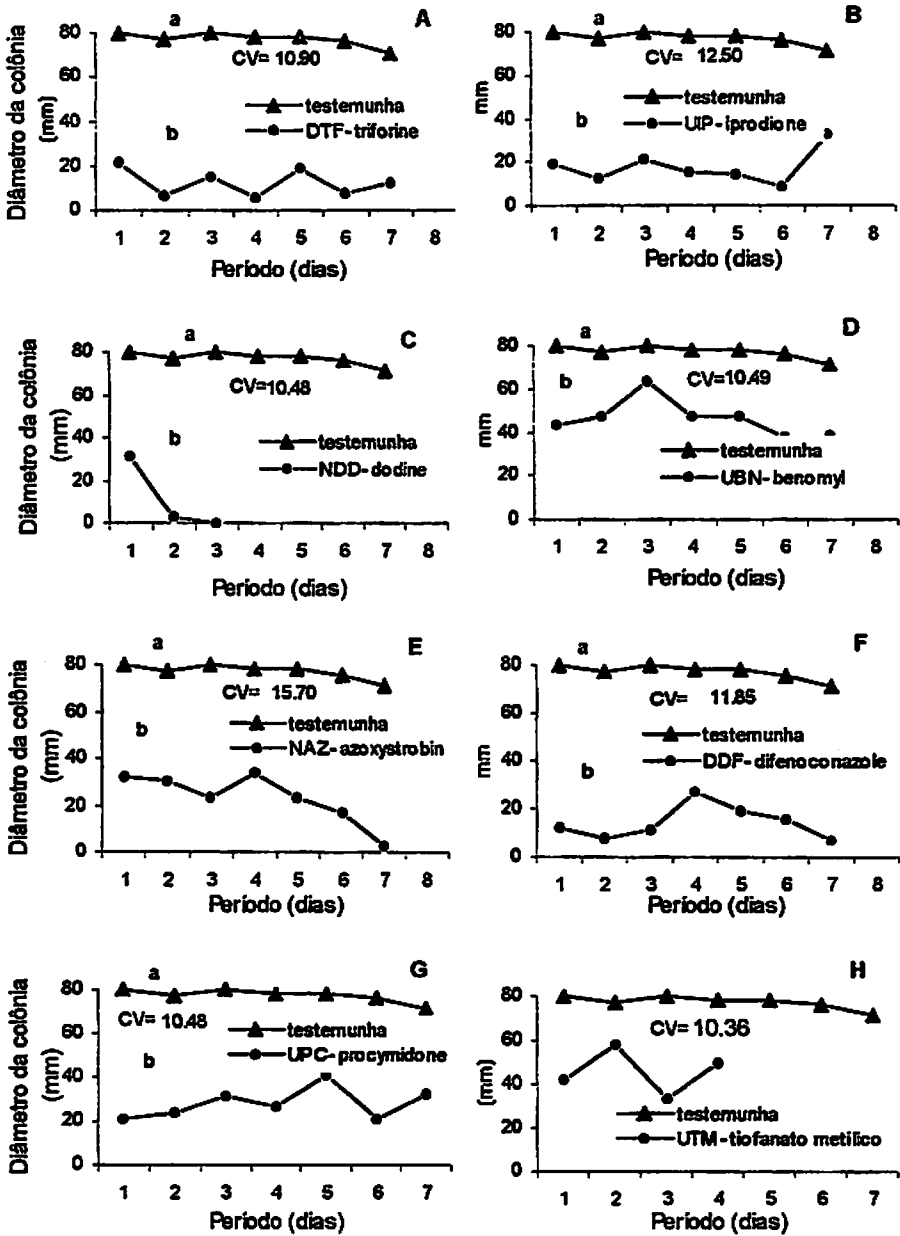


FIGURA 3 – Estabilidade do crescimento micelial das linhagens resistente a fungicidas em meio com fungicida, e do isolado de *Botrytis cinerea*. Média seguida por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

sendo inibido logo na 1ª repicagem. A linhagem NAZ (E) demonstrou realmente ser insensível ao fungicida azoxystrobin. As linhagens NDD (C) e NTF demonstraram não ter adquirido resistência e nem adaptabilidade aos fungicidas dodine e tolitfluaniid.

5.7 Resistência cruzada e dupla resistência das linhagens ao iprodione

Os resultados da avaliação da resistência cruzada e dupla resistência ao iprodione podem ser observadas na Tabela 4. Observa-se que muitas das linhagens colocadas no meio com fungicida iprodione não tiveram capacidade de se desenvolver.

As linhagens DDF, DPP e DTB desenvolveram-se, demonstrando resistência cruzada entre os fungicidas DMI's e dupla resistência com o iprodione, mas as linhagens DCP, DTD e DTF não apresentaram crescimento micelial.

A linhagem UBN apresentou dupla resistência ao iprodione, entretanto, a linhagem UTM não adquiriu resistência ao iprodione. A linhagem UPC mostrou-se com resistência cruzada ao iprodione, fato confirmado por Lorenz (1994) quando descreve a resistência cruzada entre os fungicidas do grupo dos dicarboximidas. Provavelmente, os dicarboximidas apresentam similaridade no modo de ação (Papas e Fisher, 1979) devido ao o isolado apresentar resistência cruzada entre iprodione e procymidone. A linhagem UCP não demonstrou adquirir resistência ao iprodione; neste caso, o isolado necessitaria de mutação em vários genes devido ao captan apresentar vários modos de ação.

A linhagem NQZ foi a que apresentou maior desenvolvimento do crescimento micelial, demonstrando ter maior resistência ao iprodione. Dentre as linhagens provenientes dos fungicidas protetores, apenas a linhagem NCH apresentou dupla resistência ao iprodione, fato não explicado, pois chlorotalonil

age em vários processos metabólicos vitais. As linhagens NAZ, NDD e NTL não desenvolveram crescimento micelial. Apesar da ineficiência do azoxystrobin para inibir o crescimento micelial, este foi capaz de selecionar linhagem não adaptada ao iprodione. Dodine e tolilfluanid, além de apresentarem eficiência na inibição do crescimento micelial, foram capazes de selecionar linhagens não adaptadas ao iprodione. As linhagens NDM e NDT desenvolveram-se no meio com iprodione.

TABELA 4 - Diâmetro da colônia (mm) de *Botrytis cinerea*, sobre o meio com o fungicida iprodione. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Linhagens	Idade da cultura (dias)	
	4	8
¹ D ₁ DCP (cyproconazole)	0.00	0.00
DDF (difenoconazole)	0.50	16.50
DPP (propiconazole)	26.50	41.50
DTB (tebuconazole)	2.74	5.80
DTD (triadimenol)	0.00	0.00
DTF (triforine)	0.00	0.00
UBN (benomyl)	1.74	8.24
UCP (captan)	0.00	0.00
UIP (iprodione)	10.50	49.00
UPC (procymidone)	12.50	18.50
UTM (tiof. metílico)	0.00	0.00
NAZ (azoxystrobin)	0.00	0.00
NCH (chlorotalonil)	1.22	11.50
NDM (dimethomorph)	1.22	7.74
NDT (dithianon)	33.00	36.50
NDD (dodine)	0.00	0.00
NQZ (quintozene)	54.00	56.00
NTF (tolilfluanid)	0.00	0.00

1\ distinção da procedência das linhagens, sendo a primeira letra: D (grupo dos DMI's), U (fungicida frequentemente aplicado na área) e N (fungicida nunca aplicado na área).

5.8 Resistência cruzada e dupla resistência das linhagens ao benomyl

Os resultados da avaliação da resistência cruzada e dupla resistência ao benomyl podem ser observadas na Tabela 5. A maioria das linhagens estudadas mostraram capacidade de desenvolvimento micelial sobre o meio com o fungicida benomyl, com provável aquisição da resistência ao fungicida benomyl.

Dentre as linhagens obtidas aos fungicidas do grupos dos DMI's, todas desenvolveram no meio com benomyl. As linhagens que apresentaram maiores taxas de crescimento, em ordem decrescente, foram: DDF e DTB, DTD, DPP e com taxas bem menores DCP e DTF, tendo, então, grande potencial de desenvolvimento de dupla resistência entre DMI's e benzimidazóis quando forem introduzidos os fungicidas do grupo dos DMI's. Isto explica a grande variação entre as moléculas químicas, necessitando de cuidados na introdução desses fungicidas no controle de *B. cinerea*, pois pertencem a grupo químico que age em sítios específicos da rota metabólica do ergosterol.

As linhagens provenientes do isolado que sofreu pressão de seleção por alguns fungicidas demonstraram grande capacidade de desenvolvimento micelial na presença do fungicida benomyl. As linhagens UBN, UTM e UIP apresentaram altos índices de crescimento micelial, seguidos pelas linhagens UPC e UCP. Pode-se confirmar a resistência cruzada entre os benzimidazóis e a dupla resistência de benomyl com os fungicidas dicarboximidas e o captan. De maneira geral, os benzimidazóis atuaram na mitose, interferindo no fuso mitótico, observações feitas por Davidse (1994), indicando a formação de um complexo do carbendazim com a sub-unidade da microtubulina dentro do fuso das fibras, podendo levar à inibição da formação do fuso. Yarden e Katan (1994), estudando um isolado resistente ao benomyl, concluíram que a mutação no gene (designado *benA*) não inibiu a formação do fuso.

Observa-se que as linhagens NCH, NDM e NDT apresentaram amplo desenvolvimento micelial, seguidas por NDD e NQZ, e com menores taxas de crescimento, as linhagens NTF e NAZ. A grande pressão de seleção, sofrida pelo isolado em estudo, induziu com maior facilidade linhagens resistente a outros fungicidas, com adaptação ao crescimento micelial.

TABELA 5 - Diâmetro da colônia (mm) de *Botrytis cinerea*, cultivado sobre o meio contendo o fungicida benomyl. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Linhagens	Idade da cultura (dias)	
	4	8
¹ DCP (cyproconazole)	0.00	9.66
DDF (difenoconazole)	83.00	83.00
DPP (propiconazole)	41.50	41.50
DTB (tebuconazole)	55.00	83.00
DTD (triadimenol)	48.00	53.00
DTF (triforine)	0.00	2.26
UBN (benomyl)	69.50	83.00
UCP (captan)	16.00	35.00
UIP (iprodione)	83.00	83.00
UPC (procymidone)	33.50	55.00
UTM (tiof. metílico)	83.00	83.00
NAZ (azoxystrobin)	0.00	11.50
NCH (chlorotalonil)	58.00	83.00
NDM (dimethomorph)	83.00	83.00
NDT (dithianon)	83.00	83.00
NDD (dodine)	53.00	55.00
NQZ (quintozene)	53.00	63.50
NTF (tolilfluanid)	15.66	22.74
TES (testemunha)	83.00	83.00

1\ distinção da procedência das linhagens, sendo a primeira letra: D (grupo dos DMI's), U (fungicida frequentemente aplicado na área) e N (fungicida nunca aplicado na área).

6 CONCLUSÕES

- 1) O isolado de *Botrytis cinerea* em estudo demonstrou resistência aos fungicidas benomyl e tiofanato metílico e baixo nível de resistência aos fungicidas iprodione e procymidone.
- 2) A linhagem resistente ao benomyl e tiofanato metílico demonstrou adaptabilidade do crescimento micelial, estabilidade e patogenicidade, porém não se adaptou à esporulação.
- 3) Ocorreu resistência cruzada entre os fungicidas do grupo dos benzimidazóis e das dicarboximidas, e dupla resistência entre os grupos.
- 4) O isolado produziu linhagens potencialmente resistentes aos fungicidas inibidores de reação de demetilação (DMI's), porém com baixo nível de adaptabilidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M.L.B. Adaptabilidade de linhagens de *Alternaria porri* (Ellis) Chif. resistentes a iprodione obtidas *in vitro*. Piracicaba: ESALQ, 1990. 130p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- 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. cap.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, 1981.
- DEKKER, J. Countermeasures for avoiding fungicide resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, G. (ed). *Fungicide resistance in crop protection*. 1982. p.177-186.
- DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R.W. *Systemic fungicides*. 2. ed. London: Butler & Tanner, 1977. cap. 9, p. 176-197.
- DELP, C.J. Dicarboximide fungicides. In: DELP, C.J. (ed). *Fungicide resistance in North America*. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. p.45-57.
- DENNIS, C.; DAVIS, R.P. Tolerance of *Botrytis cinerea* to iprodione and vinclozolin. *Plant Pathology*, Oxford, v.28, p.131-133, sept. 1979.
- 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.
- GEORGOPOULOS, S.G. Development of fungal resistance to fungicides. In: DIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. (eds). *Antifungal Compounds - Interactions in biological and ecological systems*, v.2, 1977. cap.12, 673p.

- GHINI, R. Ocorrência e adaptabilidade de linhagens de *Botrytis squamosa* resistentes a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas. Piracicaba: ESALQ, 1987. 114p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- HISADA, Y.; TAKAKI, H.; KATO, T.; OZAKI, T.; KAWASE, Y. Fitness of procymidone-resistant *Botrytis cinera* strains developed *in vitro*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.87, p.243, 1981.
- KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds) *Manual de fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.46-95.
- KÖLLER, W.; SCHEINPFLUG, H. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. *Plant Disease*, St. Paul, v.71, n.12, p.1066-1074, dec. 1987.
- LORENZ, G. Dicarboximide fungicide. In: DELP, C.J. (ed) *Fungicide resistance in North America*. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.4, p.45-58.
- 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.
- MOORMAN, G.W.; LEASE, R.J. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant Disease*, St. Paul, v.76, n.2, p.477-480, feb. 1992.
- PAPPAS, A.C.; COOKE, B.K.; JORDAN, V.W.L. Insensitivity of *Botrytis cinerea* to iprodione, procymidone and vinclozolin and their uptake by the fungus. *Plant Pathology*, Oxford, v.28, n.2, p.71-76, june 1979.
- PEEVER, T.L.; MILGROOM, M.G. Genetic correlations in resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, n.10, p.1076-1082, oct. 1993.

- POMMER, E.H.; LORENZ, G. Dicarboximide fungicides. In: LYR, H. (ed) **Modern selective fungicides**. London: VEB/Longman, 1987. p.91-106.
- 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, n.3, 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, n.4, p.554-560, dec. 1991.
- SCHEINPFLUG, H. History o DMI fungicides and monitoring for resistance. In: DELP, C.J. (ed) **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.6, p.77-78.
- SCHUEPP, J.; LAUBER, H.P. Toleranz gegenüber MBC-fungiziden bei *Botrytis* - Populationen in rebergen in abhangingkeit von der behandlung-shaufigkeit. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.88, p.362-368, 1977
- SMITH, C.M. Benzimidazole fungicides. In: DELP, C.J. (ed) **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.3, p.23-44.
- STAUB, T.; DIRIWAECHTER, G. Status and handling of fungicide resistance in pathogens of grapevine. **Proceedings Brighton Crop Protection Conference**, v.2, p.771-780, 1986.
- YARDEN, O.; KATAN, T. Mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant phenotypes of *Botrytis cinerea*. Farnham: The British Crop Protection Council, 1994. p.264-265. (BCPC Monograph, 60: Fungicide resistance).

ANEXOS

		Páginas
ANEXO A		
TABELA 1A	Inibição do crescimento micelial por fungicidas.....	117
TABELA 2A	Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 1 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação com as entre misturas.....	117
TABELA 3A	Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 100 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação com as entre misturas.....	117
TABELA 4A	Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 1 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação das misturas com tebuconazole.....	118
TABELA 5A	Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 100 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação das misturas com tebuconazole.....	118
TABELA 6A	Percentual da inibição do crescimento micelial na concentração de 1 ppm da mistura de fungicidas com tebuconazole.....	118
TABELA 7A	Percentual da inibição do crescimento micelial na concentração de 100 ppm da mistura de fungicidas com tebuconazole.....	119
TABELA 8A	Percentual da inibição do crescimento micelial na concentração de 1 ppm da mistura entre fungicidas.	119

TABELA 9A	Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 100 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação com as entre misturas.....	119
 ANEXO B		
TABELA 1B	Percentual de esporulação das linhagens resistentes aos fungicidas.....	120
TABELA 2B	Percentual de germinação do esporos das linhagens resistentes aos fungicidas.....	120
TABELA 3B	Índice de crescimento micelial da linhagem (DTC) resistentes ao fungicida tebuconazole, submetido ao teste de Dunnet.....	120
TABELA 4B	Índice de crescimento micelial da linhagem (DCP) resistentes ao fungicida cyproconazole, submetido ao teste de Dunnet.....	121
TABELA 5B	Índice de crescimento micelial da linhagem (DDF) resistentes ao fungicida difeconazole, submetido ao teste de Dunnet.....	121
TABELA 6B	Índice de crescimento micelial da linhagem (DPP) resistentes ao fungicida propiconazole, submetido ao teste de Dunnet.....	121
TABELA 7B	Índice de crescimento micelial da linhagem (NAZ) resistentes ao fungicida azoxystrobin, submetido ao teste de Dunnet.....	122

TABELA 8B	Índice de crescimento micelial da linhagem (UBN) resistentes ao fungicida benomyl, submetido ao teste de Dunnet.....	122
TABELA 9B	Índice de crescimento micelial da linhagem (UIP) resistentes ao fungicida iprodione, submetido ao teste de Dunnet.....	122
TABELA 10B	Índice de crescimento micelial da linhagem (NQZ) resistentes ao fungicida quitozene, submetido ao teste de Dunnet.....	123
TABELA 11B	Índice de crescimento micelial da linhagem (UTM) resistentes ao fungicida tiofanato metílico, submetido ao teste de Dunnet.....	123
TABELA 12B	Índice de crescimento micelial da linhagem (UPC) resistentes ao fungicida procymidone, submetido ao teste de Dunnet.....	123
TABELA 13B	Índice de crescimento micelial da linhagem (NDM) resistentes ao fungicida dimethomorph, submetido ao teste de Dunnet.....	124
TABELA 14B	Índice de crescimento micelial da linhagem (NDT) resistentes ao fungicida dithianon, submetido ao teste de Dunnet.....	124
TABELA 15B	Índice de crescimento micelial da linhagem (NCH) resistentes ao fungicida chlorotalonil, submetido ao teste de Dunnet.....	124

TABELA 16B	Índice de crescimento micelial da linhagem (DTD) resistentes ao fungicida triadimenol, submetido ao teste de Dunnet.....	125
TABELA 17B	Índice de crescimento micelial da linhagem (UCP) resistentes ao fungicida captan, submetido ao teste de Dunnet.....	125
TABELA 18B	Índice de crescimento micelial da linhagem (DTF) resistentes ao fungicida tebuconazole, submetido ao teste de Dunnet.....	125
TABELA 19B	Índice de crescimento micelial da linhagem (NDD) resistentes ao fungicida dodine, submetido ao teste de Dunnet.....	126
TABELA 20B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (DTF) no meio com o fungicida triforine, submetido ao teste de Dunnet.....	126
TABELA 21B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NAZ) no meio com o fungicida azoxystrobin, submetido ao teste de Dunnet.....	126
TABELA 22B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UIP) no meio com o fungicida iprodione, submetido ao teste de Dunnet.....	127
TABELA 23B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (DDF) no meio com o fungicida difenoconazole, submetido ao teste de Dunnet.....	127

TABELA 24B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UPC) no meio com o fungicida procymidone, submetido ao teste de Dunnet.....	127
TABELA 25B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UBN) no meio com o fungicida benomyl, submetido ao teste de Dunnet.....	128
TABELA 26B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UTM) no meio com o fungicida tiofanato metilico, submetido ao teste de Dunnet.....	128
TABELA 27B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NDM) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	128
TABELA 28B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NDT) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	129
TABELA 29B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NQZ) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	129
TABELA 30B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (DPP) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet	129
TABELA 31B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NDD) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	130
TABELA 32B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UIP) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.	130

TABELA 33B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NTM) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	130
TABELA 34B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NCH) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	131
TABELA 35B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UBN) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	131
TABELA 36B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NTL) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	131
TABELA 37B	Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UPC) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.....	132

TABELA 1A - Inibição do crescimento micelial por fungicidas.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	79	259008.01	3278.58	62.02	0.0001
ERRO	240	12686.37	52.85		
TOTAL	319	271694.38			

Média Geral: 40.76

C.V.(%) 17.83

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 2A - Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 1 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação com as entre misturas.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	4	10787.95	2696.98	12.19	0.0001
ERRO	15	3318.51	221.23		
TOTAL	19	14106.47			

Média Geral: 36.80

C.V.(%) 40.41

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 3A - Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 100 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação com as entre misturas.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	4	12364.71	3091.17	15.92	0.0000
ERRO	15	2911.25	194.08		
TOTAL	19	15275.96			

Média Geral: 54.24

C.V.(%) 25.68

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 4A - Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 1 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação das misturas com tebuconazole.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	9	15753.00	1750.33	9.59	0.0000
ERRO	30	5475.03	182.50		
TOTAL	39	21228.04			

Média Geral: 45.30

C.V. (%) 29.82

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 5A - Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 100 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação das misturas com tebuconazole.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	9	39215.83	4357.31	40.03	0.0000
ERRO	30	3265.51	108.85		
TOTAL	39				

Média Geral: 66.59

C.V. (%) 15.66

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 6A - Percentual da inibição do crescimento micelial na concentração de 1 ppm da mistura de fungicidas com tebuconazole.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	9	18069.52	2007.72	10.43	0.0000
ERRO	21	4042.50	192.50		
TOTAL	30	22112.03			

Média Geral: 64.15

C.V. (%) 21.62

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 7A - Percentual da inibição do crescimento micelial na concentração de 100 ppm da mistura de fungicidas com tebuconazole.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	8	6.00	0.75	1.00	0.4690
ERRO	18	13.50	0.75		
TOTAL	26				

Média Geral: 99.83

C.V. (%) 0.86

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 8A - Percentual da inibição do crescimento micelial na concentração de 1 ppm da mistura entre fungicidas.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	6	23960.60	3993.43	316.21	0.0000
ERRO	21	265.20	12.62		
TOTAL	27	24225.80			

Média Geral: 73.11

C.V.(%) 4.86

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 9A - Percentual de inibição do crescimento micelial na concentração de 100 ppm dos fungicidas utilizadas na comparação com as entre misturas.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	9	40790.09	4532.23	417.39	0.0000
ERRO	30	325.75	10.85		
TOTAL	39	41115.85			

Média Geral: 76.61

C.V.(%) 4.30

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 1B- Percentual de esporulação das linhagens resistentes aos fungicidas.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	18	10.4482	0.5804	411.503	0.0000
ERRO	57	0.0804	0.0014		
TOTAL	75	10.52862			

Média Geral: 1.77

C.V.(%) 2.12

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 2B- Percentual de germinação do esporos das linhagens resistentes aos fungicidas.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	16	39198.4705	2449.9041	38.936	0.0000
ERRO	51	3209.000	62.9215		
TOTAL	67	42407.4705			

Média Geral: 79.08

C.V.(%) 10.02

SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.

TABELA 3B- Índice de crescimento micelial da linhagem (DTC) resistentes ao fungicida tebuconazole, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	203.5455	203.5457	226.21	0.0001
ERRO	6	5.3988	0.8998		
TOTAL	7	208.9443			

Média Geral: 40.10

C.V.(%) 2.36

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 4B- Índice de crescimento micelial da linhagem (DCP) resistentes ao fungicida cyproconazole, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	1.1927	1.1927	0.07	0.8072
ERRO	6	110.0274	18.3379		
TOTAL	7	111.2201			

Média Geral: 34.67

C.V.(%) 12.35

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 5B- Índice de crescimento micelial da linhagem (DDF) resistentes ao fungicida difeconazole, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	323.2407	323.2407	343.58	0.0001
ERRO	6	5.6447	0.9407		
TOTAL	7	328.8854			

Média Geral: 41.41

C.V.(%) 2.34

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 6B- Índice de crescimento micelial da linhagem (DPP) resistentes ao fungicida propiconazole, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	272.8331	272.8331	179.63	0.0001
ERRO	6	9.1129	1.5188		
TOTAL	7	281.9460			

Média Geral:

C.V.(%)

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 7B- Índice de crescimento micelial da linhagem (NAZ) resistentes ao fungicida azoxystrobin, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	271.9578	271.9578	159.90	0.0001
ERRO	6	10.2045	1.7007		
TOTAL	7	282.1624			

Média Geral: 40.8882

C.V.(%) 3.18

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 8B- Índice de crescimento micelial da linhagem (UBN) resistentes ao fungicida benomyl, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	132.0556	132.0556	145.51	0.0001
ERRO	6	5.4453	0.9075		
TOTAL	7	137.5009			

Média Geral: 39.12

C.V.(%) 2.43

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 9B- Índice de crescimento micelial da linhagem (UIP) resistentes ao fungicida iprodione, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	186.6601	186.6601	198.29	0.0001
ERRO	6	5.6481	0.9413		
TOTAL	7	192.3083			

Média Geral: 39.88

C.V.(%) 2.43

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 10B- Índice de crescimento micelial da linhagem (NQZ) resistentes ao fungicida quintozene, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	207.7639	207.7639	189.16	0.0001
ERRO	6	6.5901	1.0983		
TOTAL	7	214.3540			

Média Geral: 40.15

C.V.(%) 2.61

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 11B- Índice de crescimento micelial da linhagem (UTM) resistentes ao fungicida tiofanato metílico, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	132.5924	132.5924	97.85	0.0001
ERRO	6	8.1306	1.3551		
TOTAL	7	140.7231			

Média Geral: 39.12

C.V.(%) 2.97

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 12B- Índice de crescimento micelial da linhagem (UPC) resistentes ao fungicida procymidone, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	261.1526	261.1526	52.04	0.0004
ERRO	6	30.1106	5.0184		
TOTAL	7	291.2632			

Média Geral: 29.34

C.V.(%) 7.63

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 13B- Índice de crescimento micelial da linhagem (NDM) resistentes ao fungicida dimethomorph, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	195.2189	195.2189	157.51	0.0001
ERRO	6	7.4364	1.2394		
TOTAL	7	202.6553			

Média Geral: 39.99

C.V.(%) 2.78

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 14B- Índice de crescimento micelial da linhagem (NDT) resistentes ao fungicida dithianon, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	108.7370	108.7370	100.25	0.0001
ERRO	6	6.5077	1.0846		
TOTAL	7	115.2448			

Média Geral: 38.74

C.V.(%) 2.68

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 15B- Índice de crescimento micelial da linhagem (NCH) resistentes ao fungicida chlorotalonil, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	1069.091	1069.091	191.37	0.0001
ERRO	6	33.5184	5.5864		
TOTAL	7	1102.610			

Média Geral: 23.49

C.V.(%) 10.05

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 16B- Índice de crescimento micelial da linhagem (DTD) resistentes ao fungicida triadimenol, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	619.784	619.784	16.78	0.0064
ERRO	6	221.653	36.942		
TOTAL	7	841.437			

Média Geral: 26.25

C.V.(%) 23.14

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 17B- Índice de crescimento micelial da linhagem (UCP) resistentes ao fungicida captan, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	154.7128	154.7128	1.50	0.2662
ERRO	6	617.6869	102.9478		
TOTAL	7	772.3997			

Média Geral: 30.66

C.V.(%) 33.09

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 18B- Índice de crescimento micelial da linhagem (DTF) resistentes ao fungicida tebuconazole, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	189.3458	189.3458	159.44	0.0001
ERRO	6	7.1255	1.1875		
TOTAL	7	196.4713			

Média Geral: 30.19

C.V.(%) 3.60

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 19B- Índice de crescimento micelial da linhagem (NDD) resistentes ao fungicida dodine, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	1047.057	1047.057	642.17	0.0001
ERRO	6	9.782	1.630		
TOTAL	7	1056.840			

Média Geral: 23.61

C.V.(%) 5.40

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 20B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (DTF) no meio com o fungicida triforine, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	3632.160	3632.160	604.76	0.0001
ERRO	12	72.071	6.005		
TOTAL	13	3704.232			

Média Geral: 22.46

C.V.(%) 10.90

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 21B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NAZ) no meio com o fungicida azoxystrobin, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	2551.500	2551.500	164.68	0.0001
ERRO	12	185.928	15.494		
TOTAL	13	2737.428			

Média Geral: 25.07

C.V.(%) 15.70

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 22B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UIP) no meio com o fungicida iprodione, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	3090.285	3090.285	351.26	0.0001
ERRO	12	105.571	8.797		
TOTAL	13	3195.857			

Média Geral: 23.71

C.V.(%) 12.50

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 23B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (DDF) no meio com o fungicida difenoconazole, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	3457.142	3457.142	471.05	0.0001
ERRO	12	88.071	7.339		
TOTAL	13	3545			

Média Geral: 22.857

C.V.(%) 11.85

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 24B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UPC) no meio com o fungicida procymidone, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	2100.875	2100.875	275.74	0.0001
ERRO	12	91.428	7.619		
TOTAL	13	2192.303			

Média Geral: 26.32

C.V.(%) 10.48

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 25B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UBN) no meio com o fungicida benomyl, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	825.445	825.446	78.52	0.0001
ERRO	12	126.142	10.511		
TOTAL	13	951.589			

Média Geral: 30.892

C.V.(%) 10.49

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 26B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UTM) no meio com o fungicida tiofanato metílico, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	627.143	627.142	56.22	0.0001
ERRO	9	100.401	11.155		
TOTAL	10	727.545			

Média Geral: 32.86

C.V.(%) 10.16

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 27B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NDM) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	84.050	84.050	0.90	0.3565
ERRO	18	1689.000	93.833		
TOTAL	19	1773.050			

Média Geral: 78.15

C.V.(%) 12.39

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 28B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NDT) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	94.612	94.612	1.68	0.2113
ERRO	18	1013.625	56.312		
TOTAL	19	1108.237			

Média Geral: 78.02

C.V.(%) 9.61

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 29B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NQZ) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	28.800	28.800	0.45	0.5122
ERRO	18	1159.200	64.400		
TOTAL	19	1188.000			

Média Geral: 79.00

C.V.(%) 10.15

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 30B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (DPP) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	1.800	1.800	0.02	0.879
ERRO	18	1376.200	76.455		
TOTAL	19	1378.000			

Média Geral: 80.50

C.V.(%) 10.86

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 31B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NDD) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	1036.800	1036.800	2.41	0.1379
ERRO	18	7742.700	430.150		
TOTAL	19	8779.500			

Média Geral: 73.00

C.V.(%) 28.41

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 32B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UIP) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	23.112	23.112	0.48	0.4977
ERRO	18	868.625	48.256		
TOTAL	19	891.737			

Média Geral:

C.V.(%)

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 33B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NTM) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	864.612	864.612	4.99	0.0385
ERRO	18	3120.825	173.379		
TOTAL	19	3985.437			

Média Geral: 73.62

C.V.(%) 17.88

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 34B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NCH) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	2808.450	2808.450	11.13	0.0037
ERRO	18	4543.100	252.394		
TOTAL	19	7351.550			

Média Geral: 68.35

C.V.(%) 23.24

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 35B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UBN) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	183.012	183.012	2.81	0.0007
ERRO	18	1170.625	65.034		
TOTAL	19	1353.637			

Média Geral: 77.17

C.V.(%) 10.44

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 36B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (NTL) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	8236.816	8236.816	107.43	0.0001
ERRO	14	1073.433	76.673		
TOTAL	15	9310.250			

Média Geral: 62.62

C.V.(%) 13.98

SAS - General Linear Models Procedure

TABELA 37B- Estabilidade do crescimento micelial da linhagem (UPC) no meio BDA, submetido ao teste de Dunnet.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
TRATAMENTO	1	11570.00	11570.00	228.54	0.0001
ERRO	17	860.655	50.626		
TOTAL	18	12430.65			

Média Geral: 56.78

C.V.(%) 12.52

SAS - General Linear Models Procedur