

Eficiência de Fungicidas Sistêmicos para o Controle de *Cylindrocladium candelabrum* em Eucalipto

Eraclides M. Ferreira, Acelino C. Alfenas, Luiz A. Maffia & Reginaldo G. Mafia

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, e-mail: aalfenas@ufv.br

(Aceito para publicação em 03/10/06)

Autor para correspondência: Acelino C. Alfenas

FERREIRA, E.M., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. & MAFIA, R.G. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. Fitopatologia Brasileira 31:468-475. 2006.

RESUMO

Várias espécies de *Cylindrocladium* podem causar doenças em mudas de eucalipto, na propagação clonal. Apesar de, em algumas situações, fungicidas serem imprescindíveis no controle desses patógenos, faltam estudos para avaliar a efetividade desses produtos. Por isso, objetivou-se selecionar fungicidas sistêmicos para controlar *C. candelabrum*, determinar o efeito protetor, curativo e anti-esporulante dos fungicidas, sua translocação e persistência em plantas de eucalipto. Nos experimentos *in vitro* foram testados: azoxystrobin (AZO), triadimenol (TRI), boscalid (BOS), pyraclostrobin (PYR), carbendazim (CAR), tetraconazole (TET), tebuconazole (TEB), epoxiconazole+pyraclostrobin (EPO-PYR) e epoxiconazole (EPO) nas concentrações 0,1, 1, 5, 10, 50, 100 e 1000 µg de i.a/mL. Nos experimentos *in vivo*, utilizou-se um clone suscetível a *C. candelabrum* (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). Excetuando-se o estudo da atividade translaminar, aplicaram-se os fungicidas, em ambas as faces do limbo foliar. Após 24 h, as plantas foram inoculadas com suspensão de 10⁵ conídios/mL de *C. candelabrum*. Testou-se o efeito protetor dos fungicidas, em diferentes concentrações: AZO (0,2; 0,25; 0,4; 0,65 e 0,8 g/L), EPO (0,75; 1,125; 1,5; 1,875 e 2,25 mL/L), EPO-PYR (1,25; 1,875; 2,5; 3,125 e 3,75 mL/L), PYR (0,75; 1,125; 1,5; 1,875 e 2,25 mL/L) e TEB (0,75; 1,125; 1,5; 1,875 e 2,25 mL/L), selecionados nos testes *in vitro*. Para avaliar o efeito curativo, anti-esporulante, a persistência e a atividade translaminar, utilizaram-se os fungicidas: AZO (0,4 g/L), EPO (1,5 mL/L), EPO-PYR (2,5 mL/L) e TEB (1,5 mL/L). Obteve-se efeito protetor, curativo e anti-esporulante com EPO, EPO-PYR e TEB, os quais tiveram atividade translaminar e persistência nos tecidos foliares.

Palavras-chave adicionais: *Eucalyptus*, miniestacas, triazóis, estrobilurinas, controle químico.

ABSTRACT

Efficiency of systemic fungicides for control of *Cylindrocladium candelabrum* in eucalypt

Several *Cylindrocladium* species may cause diseases in eucalyptus mini-cuttings. Although the use of fungicides is sometimes indicated, there are few studies evaluating fungicides in eucalyptus nurseries. Therefore, systemic fungicides were used against *C. candelabrum* to evaluate their protective, curative, and antispore effects, as well as their translocation and persistence in eucalyptus plants. Under *in vitro* conditions, azoxystrobin (AZO), triadimenol (TRI), boscalid (BOS), pyraclostrobin (PYR), carbendazim (CAR), tetraconazole (TET), tebuconazole (TEB), epoxiconazole + pyraclostrobin (EPO-PYR) and epoxiconazole (EPO), were used in the following concentrations: 0,1, 1, 5, 10, 50, 100 and 1000 µg a.i./mL. For the *in vivo* experiment, a clone (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) susceptible to *C. candelabrum* was used. The fungicides were sprayed on both leaf sides (except for the translaminar activity evaluation), the plants were allowed to dry out for 24 h, and inoculated with a 10⁵ conidia/mL suspension. Protective effect of AZO (0.2; 0.25; 0.4; 0.65 and 0.8 g/L), EPO (0.75; 1.125; 1.5; 1.875 and 2.25 mL/L), EPO-PYR (1.25; 1.875; 2.5; 3.125 and 3.75 mL/L), PYR (0.75; 1.125; 1.5; 1.875 and 2.25 mL/L) and TEB (0.75; 1.125; 1.5; 1.875 and 2.25 mL/L), was evaluated at different concentrations. In subsequent experiments, the following fungicides (concentrations) were used: AZO (0.4 g/L), EPO (1.5 mL/L), EPO-PYR (2.5 mL/L) and TEB (1.5 mL/L). The fungicides EPO, EPO-PYR and TEB promoted protective, curative, and antispore effects, as well as translaminar translocation and persistence in the leaves.

Additional keywords: *Eucalyptus*, mini-cuttings, triazoles, strobilurins, chemical control.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a maioria das empresas eucaliptocultoras no Brasil utiliza a clonagem por miniestaca. Essa técnica é composta basicamente de cinco fases: (1) produção de brotações em minijardim clonal sob cobertura translúcida fixa ou retrátil, (2) enraizamento, (3) aclimação à sombra, (4) crescimento e (5) rustificação a céu aberto

(Alfenas *et al.*, 2004). No minijardim, as minicepas são mantidas em canaletões suspensos, preenchidos com areia e fertirrigação por gotejamento ou em tanques de hidroponia. Na primeira fase, os fungos fitopatogênicos que ocorrem são *Quambalaria eucalypti* (M.J. Wingf., Crous & M.W. Swart) J.A. Simpson, *Cylindrocladium* spp., *Puccinia psidii* G. Winter e *Oidium eucalypti* Rostr., que podem causar manchas foliares e reduzir a área fotossintética da planta. Na

fase de enraizamento as miniestacas são mantidas durante 20-25 dias sob condições de alta umidade em casa-de-enraizamento, condições geralmente favoráveis a *Botrytis cinerea* Pers., *Cylindrocladium* spp. e *Rhizoctonia* spp., bem como a patógenos de ferimentos como *Pestalotiopsis* sp. e *Hainesia* sp. No final dessa fase, as mudas enraizadas são separadas, e as estacas mortas e/ou doentes são descartadas. Esse procedimento ajuda a eliminar inóculo para a fase seguinte. Na fase de aclimação, as mudas são deixadas a céu aberto, em canteiros suspensos ou no chão. Nessa fase, recomenda-se aumentar o espaçamento para minimizar a ocorrência de patógenos e reduzir a aplicação de fungicidas. Todavia, períodos prolongados de chuva tornam o ambiente favorável a patógenos, havendo a necessidade de aplicações de fungicidas (Alfenas *et al.*, 2004).

Muitas espécies de *Cylindrocladium*, freqüentemente, causam doenças em viveiros de *Eucalyptus* no Brasil (Alfenas *et al.*, 2004), sendo que *C. candelabrum* Viégas ocorre mais comumente. Quando as condições estão favoráveis ao desenvolvimento de *Cylindrocladium*, o uso de fungicidas torna-se necessário. Por isso, o estudo do efeito de fungicidas em plantas de eucalipto é fundamental, principalmente para evitar aplicações desnecessárias e para selecionar produtos mais efetivos para o controle das enfermidades causadas por *Cylindrocladium* spp.

Portanto, neste trabalho, objetivou-se selecionar fungicidas sistêmicos mais efetivos para o controle de doenças causadas por *C. candelabrum* em viveiros de eucalipto. Determinaram-se, também, o efeito protetor, curativo e anti-esporulante dos fungicidas, bem como sua translocação e persistência em plantas de eucalipto.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungicidas e concentrações testadas *in vitro*

Utilizaram-se os princípios ativos azoxystrobin, triadimenol, boscalid, pyraclostrobin, carbendazim, tetraconazole, tebuconazole, epoxiconazole + pyraclostrobin e epoxiconazole. De cada produto, as concentrações testadas foram 0,1, 1, 5, 10, 50, 100 e 1000 µg de i.a./mL.

Inibição da germinação de conídios

Suspensões de conídios de *C. candelabrum* foram obtidas a partir de colônias em crescimento com esporulação em meio batata, dextrose e ágar (BDA), após 10 dias de incubação a 27°C e fotoperíodo de 12 h. Adicionou-se cada princípio ativo à suspensão de conídios, para se obter cada uma das concentrações desejadas e suspensão final de 2×10^4 conídios/mL. Após homogeneização, 50 µl da suspensão foram pipetados para 3 lâminas de vidro escavadas, que foram colocadas em câmara úmida a 27°C sob fotoperíodo de 12 h. Como controle, utilizou-se uma suspensão de conídios em água destilada esterilizada. Após 18 h de incubação, quantificou-se a germinação dos conídios. Consideraram-se como germinados, os conídios cujos tubos germinativos tinham comprimento igual ou superior à maior dimensão

do esporo. Uma lâmina foi considerada como uma unidade experimental.

Inibição do crescimento micelial

Avaliou-se a eficiência de fungicidas em inibir o crescimento micelial de *C. candelabrum*. Para tanto, soluções-estoque (10.000 µg do i.a./mL) de fungicidas foram diluídas em água esterilizada, para atingir a concentração desejada em meio de cultura. Adicionaram-se 5 mL da solução diluída dos respectivos fungicidas em 45 mL de meio de BDA fundente a 45 °C. Para a testemunha, adicionaram-se 5 mL de água destilada esterilizada. Após homogeneização da mistura, verteram-se os 50 mL em quantidades aproximadamente iguais para três placas de Petri (9 cm de diâmetro). Discos de cultura em BDA, de 7 mm de diâmetro, obtidos das bordas das colônias com cinco dias de idade, foram repicados para o centro das placas de cada tratamento. A seguir, incubou-se a 27 °C sob fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa 10 µM de fótons/m²/seg. Após cinco dias, avaliou-se o diâmetro das colônias nos dois sentidos ortogonais e calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação a testemunha.

Eficiência dos fungicidas em plantas de eucalipto

Mudas clonais (*E. grandis* x *E. urophylla*) com 60 dias de idade produzidas em tubetes, foram transplantadas para vasos contendo solo, esterco e areia (proporção de 4:2:1 v/v) e 1 g de superfosfato simples por litro da mistura. As mudas foram mantidas em casa-de-vegetação por 20-30 dias e, semanalmente, foram adubadas com 4,4 g/L de nutriente Ouro verde®. As plantas foram inoculadas com suspensão de 10^5 conídios/mL de *C. candelabrum* pela aspersão com o auxílio de um pulverizador manual.

Com base nos testes *in vitro*, azoxystrobin, pyraclostrobin, tebuconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e epoxiconazole foram selecionados para os testes *in vivo*. Os fungicidas foram veiculados em água e aplicados com atomizador manual. À exceção da atividade translaminar, aplicaram-se, os fungicidas, em ambas as faces do limbo foliar.

Efeito protetor

Testou-se o efeito protetor em diferentes concentrações de azoxystrobin (0,2; 0,25; 0,4; 0,65 e 0,8 g/L), epoxiconazole (0,75; 1,125, 1,5, 1,875 e 2,25 mL/L); epoxiconazole+pyraclostrobin (1,25; 1,875; 2,5; 3,125 e 3,75 mL/L), pyraclostrobin (0,75; 1,125, 1,5, 1,875 e 2,25 mL/L) e tebuconazole (0,75; 1,125, 1,5, 1,875 e 2,25 mL/L). A concentração mediana foi determinada com base em concentrações recomendadas comercialmente para culturas agrônômicas. As demais concentrações são 25 e 50% inferiores e superiores a concentração mediana. Após 24 h da pulverização com os fungicidas, inoculou-se *C. candelabrum*. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro com nebulização intermitente (15 s de nebulização a cada 30 min) por 48 h a 25°C e posteriormente, foram transferidas para casa-de-vegetação. Após cinco dias,

quantificou-se o número de lesões por folha (englobando toda a planta) e calculou-se a porcentagem média de lesões/folha em relação testemunha.

Efeito curativo

Utilizaram-se os seguintes fungicidas e concentrações: azoxystrobin (0,4 g/L), epoxiconazole (1,5 mL/L), epoxiconazole+pyraclostrobin (2,5 mL/L), pyraclostrobin (1,5 mL/L) e tebuconazole (1,5 mL/L). Aos sete dias da inoculação do patógeno e aos cinco da aplicação dos fungicidas, ou seja, às 48 horas após da aplicação dos fungicidas, foram retirados cinco fragmentos/folha (5 mm de diâmetro) das bordas das lesões a fim de avaliar a sobrevivência do patógeno a partir de quatro folhas totalmente expandidas, previamente marcadas. Para isso, os fragmentos foram passados sucessivamente em álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 5% e duas lavagens sucessivas com água destilada esterilizada, e transferidos para meio ágar-água, em placa de Petri e posteriormente para placas contendo meio batata, dextrose e ágar. Após cinco dias de incubação a 27 °C, no escuro, avaliou-se o crescimento de *C. candelabrum* a partir das lesões, calculando-se a porcentagem de sobrevivência.

Efeito dos fungicidas sobre a expansão de lesões

Para avaliar o efeito sobre a expansão das lesões causadas por *C. candelabrum*, utilizaram-se os seguintes fungicidas (concentrações): azoxystrobin (0,4 g/L), epoxiconazole (1,5 mL/L), epoxiconazole+pyraclostrobin (2,5 mL/L), pyraclostrobin (1,5 mL/L) e tebuconazole (1,5 mL/L). Três plantas/tratamento e tempo foram inoculadas com o patógeno conforme descrito anteriormente e aos 0, 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação, pulverizaram-se os fungicidas. Após dois dias da última pulverização, coletaram-se dois pares de folha de cada repetição e quantificou-se a área lesionada (cm²) com o auxílio do programa Quant[®] (Vale *et al.*, 2003).

Efeito anti-esporulante

Para avaliar o efeito dos fungicidas na intensidade de esporulação, as mudas foram inoculadas e colocadas em câmara de nevoeiro e, após 48 h, foram transferidas para casa-de-vegetação. Imediatamente, pulverizaram-se os fungicidas azoxystrobin (0,4 g/L), epoxiconazole (1,5 mL/L), epoxiconazole+pyraclostrobin (2,5 mL/L) ou tebuconazole (1,5 mL/L). A seguir foram colocadas em câmara de nevoeiro, a 25 °C. Após três dias, retirou-se das lesões discos de 3 mm de diâmetro. Dez discos foram colocados em tubos de ensaio com 5 mL de água destilada esterilizada e agitados por 30 s, para haver liberação dos esporos, os quais foram quantificados com hemacitômetro.

Atividade translaminar

Avaliou-se a atividade translaminar dos seguintes fungicidas (concentrações): azoxystrobin (0,4 g/L), epoxiconazole (1,5 mL/L), epoxiconazole+pyraclostrobin (2,5 mL/L) e tebuconazole (1,5 mL/L). Mudanças de eucalipto

foram cobertas com sacos plásticos, para evitar que gotas do fungicida atingissem folhas não marcadas ou outras partes da muda, e em uma folha totalmente expandida, aplicou-se cada fungicida na superfície adaxial. Após 12, 24, 36, 48, 60 e 72h, inoculou-se o patógeno na superfície abaxial da folha. Após 48 h em câmara de nevoeiro, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação e, após cinco dias, avaliou-se o número de lesões/folha e, posteriormente, calculou-se porcentagem média de inibição da infecção/folha.

Persistência dos fungicidas

Avaliou-se a persistência dos seguintes fungicidas (concentrações): azoxystrobin (0,4 g/L), epoxiconazole (1,5 mL/L); epoxiconazole+pyraclostrobin (2,5 mL/L) e tebuconazole (1,5 mL/L). Para isso, pulverizou-se cada fungicida e após 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 dias as plantas foram inoculadas e subsequentemente, foram transferidas para casa-de-vegetação e, após cinco dias, avaliou-se o número de lesões foliares e calculou-se porcentagem média de inibição da infecção/folha.

Delineamento experimental e análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e repetidos duas vezes. Utilizou-se esquema fatorial para: os testes *in vitro* 10 x 7 (Fungicida x Concentração), efeito protetor 6 x 5 (Fungicida x Concentração), atividade translaminar 5 x 6 (Fungicida x Tempo) e persistência 5 x 6 (Fungicida x Tempo). Para avaliar o efeito sobre a expansão das lesões, calculou-se a Área Abaixo da Curva de Expansão de Lesão (AACEL). À exceção do experimento de efeito curativo realizado com quatro repetições, nos demais se utilizaram três repetições.

Para análise dos testes *in vitro*, calcularam-se os valores de CE₅₀ (concentração efetiva inibitória de 50% do crescimento micelial e da germinação de conídios), por meio da transformação log-probit, com base nos resultados da inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios, para cada fungicida. Calculou-se também a CMI (concentração mínima inibitória) de cada fungicida. A sensibilidade foi classificada em quatro categorias de acordo com a escala de Edgington *et al.* (1971) adaptada, em que: CE₅₀ < 1 µg i.a./mL: alta sensibilidade (AS); CE₅₀ 1 – 10 µg i.a./mL: moderada sensibilidade (MS); CE₅₀ 10 – 50 µg i.a./mL: baixa sensibilidade (BS) e CE₅₀ > 50 µg i.a./mL: insensibilidade (IS).

As análises foram processadas com auxílio do programa SAEG (Euclides, 1983). Utilizou-se o teste de Lilliefors para verificar a normalidade dos dados e o teste de Cochran para verificar a homogeneidade de variâncias. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparação das médias qualitativas, utilizou-se o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). No experimento de efeito protetor, os dados foram submetidos à análise de regressão (porcentagem de inibição em função do tempo). O modelo de regressão

foi escolhido com base nos desvios em relação aos valores observados e no coeficiente de determinação (R^2).

RESULTADOS

Efetividade *in vitro* dos fungicidas sistêmicos

O fungo foi altamente sensível a epoxiconazole, pyraclostrobin, pyraclostrobin-epoxiconazole e tebuconazole, tanto para a germinação de conídios quanto para o crescimento micelial. Tetraconazole foi moderadamente efetivo, enquanto triadimenol e boscalid não inibiram a germinação de conídios. Tetraconazole foi altamente eficaz, triadimenol e boscalid foram moderadamente eficazes, enquanto azoxystrobin e carbendazim não inibiram o crescimento micelial (Tabela 1).

Efeito protetor

Houve efeito significativo ($p= 0,038$) da interação fungicida-concentração, quanto ao efeito protetor. Os fungicidas tiveram efeito protetor e reduziram a infecção (Figura 1B). Azoxystrobin foi eficiente nas concentrações mais elevadas, e reduziu a severidade em aproximadamente 75%. Houve redução da severidade com o aumento na concentração de azoxystrobin (Figura 1A). Epoxiconazole, e poxiconazole+pyraclostrobin, pyraclostrobin e tebuconazole reduziram a severidade, independentemente da concentração utilizada (Figura 1B).

Efeito curativo

Os fungicidas não inibiram o crescimento do patógeno em todas as lesões. Entretanto, com a aplicação de tebuconazole, o crescimento do fungo foi inibido em mais de 20% das lesões (Tabela 2). Os demais fungicidas não diferiram estatisticamente da testemunha.

Efeito dos fungicidas sobre a expansão das lesões

Quando se analisou a área abaixo da curva da expansão da lesão (AACEL), observou-se que, à exceção de azoxystrobin, todos os fungicidas diferiram significativamente da testemunha. Os demais produtos testados foram similares entre si (Tabela 2).

Efeito anti-esporulante

Independentemente do fungicida aplicado, nas áreas lesionadas das folhas de eucalipto houve redução da esporulação de *C. candelabrum*. Para azoxystrobin, a redução foi de 60%, enquanto para tebuconazole, epoxiconazole e epoxiconazole+pyraclostrobin houve redução de 96, 98 e 95%, respectivamente, em relação à testemunha não tratada (Tabela 2).

Atividade translaminar

A atividade translaminar variou em função do tempo de aplicação e do fungicida. Para epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e tebuconazole, a redução na infecção variou de 60 a 80%, enquanto que azoxystrobin foi inefetivo (Figura 2A). Epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e tebuconazole foram eficientes após 24 h, pois não houve infecção a partir desse período.

Persistência dos fungicidas

A persistência variou com o fungicida e tempo testados. À exceção de azoxystrobin, todos os fungicidas foram eficientes em reduzir a infecção por *C. candelabrum*. Tebuconazole foi o mais eficiente em conferir proteção no intervalo de 15 dias, período em que não houve infecção. Para epoxiconazole e epoxiconazole+pyraclostrobin o intervalo foi de 10 dias (Figura 2B).

DISCUSSÃO

A germinação dos conídios de *C. candelabrum* foi influenciada, significativamente, pelos diferentes princípios

TABELA 1 – Concentração efetiva inibitória de 50% do crescimento micelial e da germinação de conídios (CE_{50}), concentração mínima inibitória (CMI) e sensibilidade de *Cylindrocladium candelabrum* a fungicidas

Fungicida	Germinação de conídios ($\mu\text{g i.a./mL}$)			Crescimento micelial ($\mu\text{g i.a./mL}$)		
	CE_{50}	Sensibilidade*	CMI	CE_{50}	Sensibilidade*	CMI
Azoxystrobin	5,40	MS	>1000	437,55	IS	>1000
Boscalid	42,22	IS	>1000	7,44	MS	>1000
Carbendazim	**	**	**	54,38	IS	>1000
Epoxiconazole	<0,1	AS	12,04	0,13	AS	47,98
Epoxiconazole+pyraclostrobin	0,55	AS	60,36	0,17	AS	134,44
Pyraclostrobin	0,21	AS	15,94	0,34	AS	843,87
Tebuconazole	0,30	AS	56,97	0,29	AS	26,30
Tetraconazole	1,08	MS	42,42	0,47	AS	>1000
Triadimenol	51,89	IS	>1000	1,40	MS	285,33

*AS – Alta Sensibilidade, MS – Moderada Sensibilidade, BS – Baixa Sensibilidade, IS – Insensível.

**valores não calculados devido à semelhança da porcentagem de inibição para as diferentes concentrações.

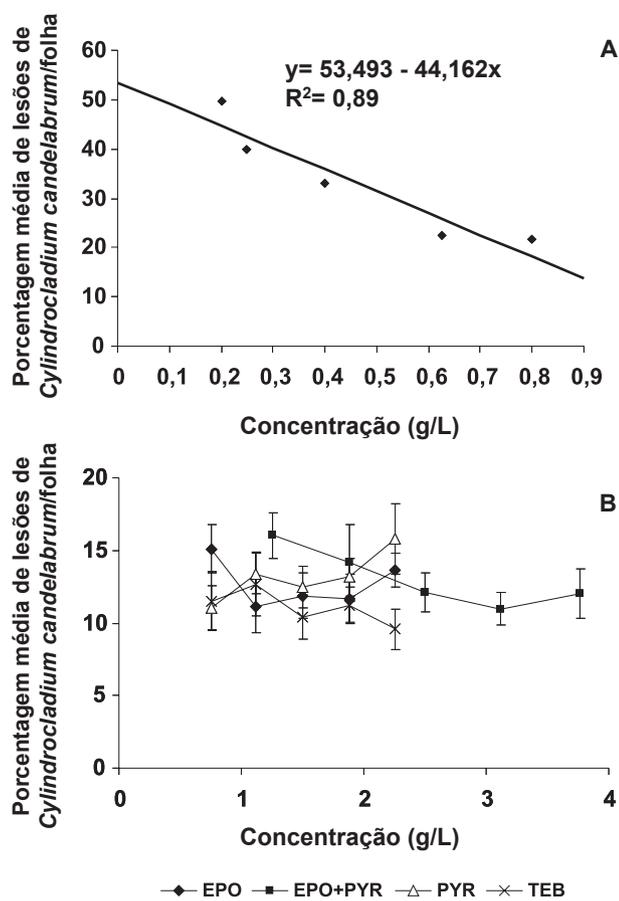


FIG. 1 – Porcentagem média lesões/folha causada por *Cylindrocladium candelabrum*, após pulverização com diferentes fungicidas em folhas de eucalipto para avaliação do efeito protetor. **A.** Porcentagem média de lesões/folha após pulverização com Azoxystrobin. A regressão foi significativa ($p = 0,0085$); **B.** Porcentagem média de lesões/folha após pulverização de Epoxiconazole (EPO), Epoxiconazole+pyraclostrobin (EPO-PYR), Pyraclostrobin (PYR) e Tebuconazole (TEB). As regressões não foram significativas. Cada ponto é a média de seis repetições.

TABELA 2 – Área abaixo da curva de expansão da lesão (AACEL), sobrevivência média em fragmentos lesionados transferidos para meio de cultura após isolamento indireto e número médio de conídios produzidos em lesões causadas por *Cylindrocladium candelabrum*

Tratamentos	AACEL	Sobrevivência média (%)	Número médio de conídios $\times 10^4$ /mL
Azoxystrobin	75,96 ab	95,00 a	26,25 b
Epoxiconazole	53,66 bc	91,70 ab	2,812 c
Epoxiconazole+pyraclostrobin	57,11 bc	85,00 ab	1,56 c
Pyraclostrobin	56,58 bc	83,30 ab	*
Tebuconazole	44,91 c	75,00 b	3,12 c
Testemunha	97,17 a	100,00 a	65 a
CV (%)	25,1	18,32	28,08

*Tratamento não testado. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem, entre si, estatisticamente pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

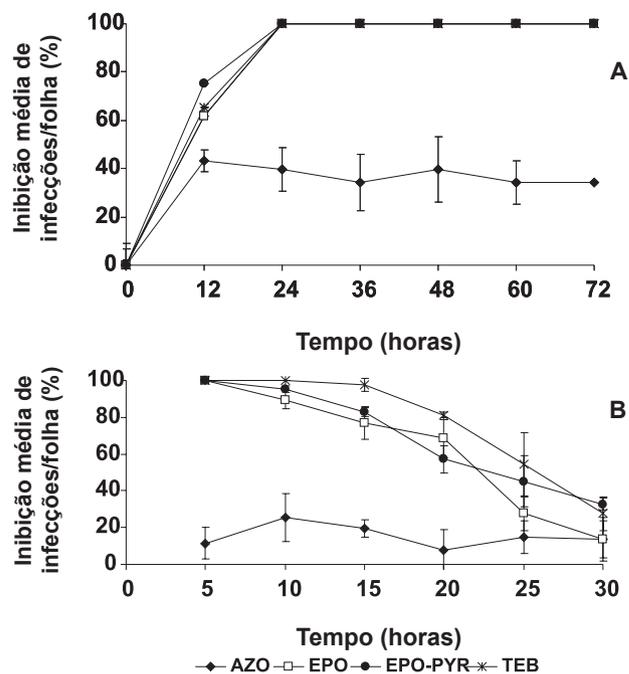


FIG. 2 – **A.** Inibição média de infecção causada por *Cylindrocladium candelabrum* na superfície abaxial de folhas de eucalipto após aplicação de fungicidas na superfície adaxial em diferentes intervalos de tempo após a inoculação; **B.** Inibição média de infecção causada por *Cylindrocladium candelabrum* em diferentes períodos, sendo Azoxystrobin (AZO), Epoxiconazole (EPO), Epoxiconazole+pyraclostrobin (EPO-PYR) e Tebuconazole (TEB) calculados em relação à testemunha.

ativos testados. Esse processo envolve grande gasto de energia e alta taxa respiratória. Sabe-se, por exemplo, que as estrobilurinas agem sobre a respiração mitocondrial do fungo, ao inibir a transferência de elétrons no complexo III da cadeia transportadora, sendo que o efeito desse grupo de fungicidas sobre a germinação de conídios já foi demonstrado para vários outros patógenos (Ypema & Gold, 1999; Reuveni & Shelglov, 2002; Karadimos *et al.*, 2005). Mesmo dentro do grupo das estrobilurinas, o efeito sobre a germinação de conídios e crescimento micelial variou conforme já relatado para *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., para a qual a germinação de conídios foi pouco sensível a azoxystrobin, mas altamente sensível a trifloxystrobin (Reuveni & Shelglov, 2002).

Quanto ao crescimento micelial, *C. candelabrum* foi altamente sensível a pyraclostrobin, mas não foi afetado por azoxystrobin. A baixa sensibilidade micelial a determinadas estrobilurinas, também, já constatada em outras espécies fúngicas, pode estar associada à indução da respiração alternativa que catalisa a transferência de elétrons para o oxigênio (Ziogas *et al.*, 1997; Olaya & Köller, 1999; Ypema & Gold, 1999). Essa rota alternativa é utilizada por fungos que crescem em meios de ágar, especialmente aqueles ricos em nutrientes (Reuveni & Shelglov, 2002). Esse fato pode estar relacionado à baixa sensibilidade de *C. candelabrum*,

visto que foi cultivado em meio BDA. A rota alternativa referenciada também foi induzida quando se utilizaram derivados de estrobilurinas (Mizutani *et al.*, 1995; Ziogas *et al.*, 1997).

Carbendazim não reduziu a germinação de conídios e o crescimento micelial de *C. candelabrum*. Para outros patógenos como *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara (Maringoni & Barros, 2002) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* W.L. Gordon (Batista *et al.*, 2002) houve a ocorrência de seleção de isolados resistentes pela aplicação desse princípio ativo. Em viveiros de eucalipto, principalmente na década de 80, fungicidas desse grupo foram usados amplamente para o controle de espécies de *Cylindrocladium* e casos de resistência também já foram relatados (Alfenas *et al.*, 1987). Nesse estudo empregou-se apenas um isolado do patógeno e, portanto, mais isolados são necessários para confirmar a existência de resistência aos princípios ativos testados.

Boscalid, do grupo das anilidas, não inibiu a germinação de conídios de *C. candelabrum*, mas inibiu moderadamente o crescimento micelial. Uma menor sensibilidade a boscalid também ocorreu com *Sclerotinia minor* Jagger quanto ao crescimento micelial (Matheron & Porchas, 2004).

Todos os fungicidas inibidores da biossíntese de ergosterol (IBE) inibiram o crescimento micelial de *C. candelabrum*, cuja sensibilidade variou de alta a moderada. Alta sensibilidade quanto ao crescimento micelial e baixa sensibilidade quanto à germinação de conídios já foram observadas em trabalhos com os IBE (Gisi *et al.*, 2000; Reuveni & Sheglov, 2002). Por exemplo, tebuconazole inibiu a germinação de conídios de vários isolados de *Botrytis cinerea* a 3 ou 5 µg i. a./mL (Elad, 1992). A eficiência na inibição da germinação de conídios de *C. candelabrum* está relacionada ao modo de ação desses fungicidas, os quais atuam sobre a biossíntese do ergosterol, componente essencial da membrana de fungos. O composto triazol age diretamente sobre a 14 α -demetilase do citocromo P450, responsável pela demetilação do carbono 14 α e impede que a enzima continue o processo de demetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol (Ghini & Kimati, 2000). Os IBE reduziram o crescimento micelial de outros patógenos (Paredes & Munoz, 2002; van den Berg *et al.*, 2002).

Os fungicidas testados proporcionaram atividade protetora a *C. candelabrum*. Entretanto, nas concentrações mais baixas, a eficiência de azoxystrobin foi reduzida. O produto também promoveu proteção altamente efetiva para *Cercospora beticola* Sacc. em beterraba açucareira, variando de 88 a 94% nas concentrações de 8 e 16 µg i. a./mL (Anesiadis *et al.*, 2003). No presente estudo, na concentração mais elevada houve controle de 75% em relação à testemunha. Em contrapartida, para pyraclostrobin não houve efeito de concentração do ingrediente ativo, pois em todas as concentrações, os números de lesões reduziram-se em, aproximadamente, 75%. Esse resultado foi compatível aos testes *in vitro*, em que azoxystrobin foi menos eficiente

que os demais fungicidas, em inibir a germinação de conídios e o crescimento micelial. Atividade protetora de estrobilurinas já foi relatada para vários outros patógenos (Ypema & Gold, 1999; Wong & Wilcox, 2001; Anesiadis *et al.*, 2003). As estrobilurinas agem na superfície da folha e inibem os primeiros estádios do processo de infecção, como a germinação de esporos, penetração e estabelecimento inicial do patógeno (Anesiadis *et al.*, 2003; Karadimos *et al.*, 2005). Os fungicidas IBE foram altamente efetivos, independentemente da concentração utilizada, e exerceram atividade protetora de aproximadamente 85%. Fungicidas desse grupo também se destacaram para o controle da ferrugem do eucalipto (Ruiz, 1988).

À exceção de azoxystrobin, os demais fungicidas tiveram atividade curativa para infecções causadas por *C. candelabrum*. Entretanto, o controle foi mais eficaz nos tratamentos protetores que nos curativos, o que já foi demonstrado em outros patossistemas (Ypema & Gold, 1999; Wong & Wilcox, 2001; Karadimos *et al.*, 2005). Azoxystrobin, quando aplicado simultaneamente à inoculação de *C. candelabrum*, proporcionou controle, o que demonstra o potencial do fungicida em inibir a germinação de conídios. Pyraclostrobin e os demais fungicidas testados inibiram o desenvolvimento do fungo dentro dos tecidos da folha. Estrobilurinas também proporcionaram esse efeito para outros patógenos (Wong & Wilcox, 2001; Anesiadis *et al.*, 2003). Fungicidas sistêmicos podem não erradicar completamente um fungo após seu estabelecimento no interior do tecido da planta e a concentração do produto que entra na folha pode restringir o desenvolvimento do fungo, mas não matá-lo (Wong & Wilcox, 2001).

Atividade translaminar de estrobilurinas já foi observada em outros patossistemas (Leinhos *et al.*, 1997; Karadimos *et al.*, 2005). Contudo, nesse estudo, azoxystrobin não foi eficiente, contrariamente ao observado para *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni em videira (Wong & Wilcox, 2001). A atividade translaminar dos fungicidas tebuconazole, epoxiconazole e epoxiconazole+pyraclostrobin, após 24 h da aplicação, foi eficiente. Após 12 h, ocorreu inibição parcial na infecção, o que indica a necessidade de pelo menos 24 h para os fungicidas atingirem a superfície abaxial na concentração ideal para reduzir em 100% a infecção por *C. candelabrum*.

Aplicações de fungicidas sobre áreas lesionadas em folhas de eucalipto resultaram em redução da esporulação de *C. candelabrum*. Em outros trabalhos, azoxystrobin foi mais eficiente na atividade anti-esporulante (Leinhos *et al.*, 1997; Anesiadis *et al.*, 2003). Os triazóis também reduziram eficientemente a produção de esporos, sendo que, tebuconazole, epoxiconazole e epoxiconazole+pyraclostrobin reduziram a esporulação em 96, 98 e 95%, respectivamente. O estabelecimento de uma doença envolve várias fases, dentre elas a dispersão do patógeno. Quando em contato com a superfície do hospedeiro, os esporos podem germinar, penetrar, colonizar e produzir uma nova safra de esporos, com potencial para infectar novas plantas (Agrios, 1997).

Portanto, a redução da quantidade de esporos por fungicidas contribui para a redução do inóculo em muitas plantas, sob condições favoráveis ao patógeno.

Dentre os fungicidas testados quanto à persistência, azoxystrobin não conferiu proteção a *C. candelabrum* na concentração testada. Contudo, em um estudo com *Puccinia psidii* em plantas de eucalipto, o efeito protetor deste fungicida, a 0,2g/L permaneceu até 21 dias após a pulverização (Zauza *et al.*, 2003).

Estudos de eficiência de fungicidas podem auxiliar nas indicações dos intervalos de aplicação e concentrações necessárias. Esses são fundamentais para o manejo de doenças, pois muitos fungicidas podem ter efeitos fitotóxicos, podendo reduzir o crescimento e interferir no desenvolvimento de plantas, se aplicados em concentrações e intervalos de tempo desnecessários (Gao *et al.*, 1988), além de possibilitar a seleção de isolados resistentes (Alfenas *et al.*, 1987; Leroux, 2003).

Dos fungicidas testados, epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e tebuconazole tiveram efetividade protetora, curativa e anti-esporulante. Esses produtos podem, também, penetrar translaminarmente e persistir por longo período dentro do tecido da planta, o que indica maior intervalo de aplicação em condições de viveiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 4th ed. San Diego CA. Academic Press. 1997.
- ALFENAS, A.C., DEMUNER, N.L. & SILVA, A.R. Resistência de *Cylindrocladium scoparium*, agente etiológico de podridão de estacas de *Eucalyptus* a benomyl. Fitopatologia Brasileira 12:158. 1987 (Resumo)
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa-Imprensa Universitária, UFV. 2004.
- ANESIADIS, T., KAROAGLANIDIS, G.S. & TZAVELLA-KLONARI, K. Protective, curative and eradicator activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. Journal of Phytopathology 151:647-651. 2003.
- BATISTA, D.C., OLIVEIRA, S.M.A., TAVARES, S.C.C.H., LARANJEIRA, D., NEVES, R.A.F. & SILVA, R.L.X. Efeitos de fungicidas sobre o crescimento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e a interferência com *Trichoderma* spp. Summa Phytopathologica 28:305-310. 2002.
- EDGINGTON, L.V., KHEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61:42-44. 1971.
- ELAD, Y. Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: fenetrazole and fenethanil. Plant Pathology 41:47-54. 1992.
- EUCLYDES, R.F. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas). Viçosa-Imprensa Universitária, UFV, 1983.
- GAO, J., HOFSTRA, G. & FLETCHER, R.A. Anatomical changes induced by triazoles in wheat seedlings. Canadian Journal of Botany 66:1178-1185. 1988
- GHINI, R. & KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna SP. Embrapa Meio Ambiente. 2000.
- GISI, U., CHIN, G.K., KANAPOVA, G., KÜNG FÄRBER, R., MOHR, U., PARISI, S., SIEROTZKI, H. & STEINFELD, U. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. Crop Protection 19:863-872. 2000.
- KARADIMOS, D.A., KARAOGLANIDIS, G.S. & TZAVELLA-KLONARI, K. Biological activity and physical modes of action of the Qo inhibitor fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin against *Cercospora beticola*. Crop Protection 24:23-29. 2005.
- LEINHOS, G.M.E., GOLD, R.E. DÜGGELIN, M. & GUGGENHEIM, R. Development and morphology of *Uncinula necator* following treatment with the fungicides Kresoxim-methyl and penconazole. Mycology Research 101:1033-1046. 1997.
- LEROUX, P. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. Comptes Rendus Biologies 326:9-21. 2003.
- MARINGONI, A.C. & BARROS, E.M. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. Summa Phytopathologica 28:197-200. 2002.
- MATHERON, M.E. & PORCHAS, A. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. Plant Disease 88:665-668. 2004.
- MIZUTANI, A., YUKIOKA, H., TAMURA, H., MIKI, N., MASUKO, M. & TAKEDA, R. Respiratory characteristics in *Pyricularia oryzae* exposed to a novel alkoxyiminoacetamide fungicide. Phytopathology 85:306-311. 1995.
- OLAYA, G. & KÖLLER, W. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. Plant Disease 83:274-278. 1999.
- PEREDES, B.S.G. & MUNOZ, F.R. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. Crop Protection 21:11-15. 2002.
- REUVENI, M. & SHEGLOV, D. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. Crop Protection 21:951-955. 2002.
- RUIZ, R.A.R. Epidemiologia e controle químico da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto. (Tese de Mestrado). Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 1988.
- VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I., & LIBERATO, J.R. QUANT. A software for plant disease severity assessment. Abstract, 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand. 2003. p.105.
- VAN DEN BERG, N., AVELING, T.A.S. & VENTER, S.L. The evaluation of six fungicides for reducing *Alternaria cassiae* on cowpea seed. Crop Protection 21:501-505. 2002.
- WONG, F.P. & WILCOX, W.F. Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (Grapevine Downy Mildew). Plant Disease 85:649-656. 2001.

YPEMA, H.L. & GOLD, R.E. Kresoxim-methyl: modifications of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* 83:4-19. 1999.

ZAUZA, E.A.V., ALFENAS, A.C., GRAÇA, R.N. & COUTO, M.M.F. Novos fungicidas sistêmicos para o controle de ferrugem

do eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 28:S338. 2003 (Resumo).

ZIOGAS, B.N., BALDWIN, B.C. & YOUNG, J.A. Alternative Respiration: a biochemical mechanism to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science* 50:28-34. 1997.