

# SENSIBILIDADE “IN VITRO” A IPRODIONE, TAXA DE CRESCIMENTO E PATOGENICIDADE DE LINHAGENS DE *Botrytis cinerea* À *Rosa* sp.

R. J. DOMINGUES<sup>1</sup>; J. G. TÖFOLI<sup>1</sup> & R. F. PINTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de P. & D. de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo-SP, Brasil. E-mail: domingues@biologico.sp.gov.br; tofoli@biologico.sp.gov.br; rodrigofp2003@yahoo.com.br;. Aceito para publicação em: 12/09/2004.

## RESUMO

Seis linhagens de *B. cinerea* obtidas de rosa, morango, lisianthus e manga foram avaliadas quanto à sensibilidade “in vitro” ao fungicida iprodione, taxa de crescimento e patogenicidade à *Rosa* sp.. A sensibilidade a iprodione foi avaliada determinando-se as porcentagens de inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 µg.mL<sup>-1</sup> de i.a. A primeira através do método do fungicida incorporado ao meio de cultura BDA e a segunda utilizando-se o método do papel celofane descrito por NELLY (1978). As taxas diárias de crescimento foram obtidas através da repicagem dos isolados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, com medições diárias de seu crescimento. A patogenicidade à *Rosa* sp. foi determinada através da inoculação de pétalas destacadas com uma gota de suspensão de conídios e posterior avaliação da severidade da doença. Os isolados apresentaram sensibilidade diferenciada para os diferentes critérios avaliados. Iprodione proporcionou elevados níveis de inibição do crescimento micelial para todos os isolados e concentrações testadas. Quanto à germinação de conídios, dois isolados apresentaram inibição completa a partir de 10 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto que outro apresentou germinação total em todas as concentrações estudadas. Em geral, os isolados menos sensíveis quanto à germinação de conídios apresentaram taxas inferiores de crescimento e severidade. Os isolados provenientes de morango, lisianthus e manga foram patogênicos à *Rosa* sp.

Palavras-Chave: resistência a fungicidas, roseira, mofo cinzento, dicarboximida.

## ABSTRACT

### SENSIBILITY “IN VITRO” TO IPRODIONE, GROWTH RATE AND PATHOGENICITY TO *Rosa* SP. OF *Botrytis cinerea* STRAINS

Six *B. cinerea* strains from rose, strawberry, lisianthus and mango were evaluated regarding the sensibility “in vitro” to the fungicide iprodione, growth and pathogenicity rate to *Rosa* sp.. The sensibility for iprodione was evaluated determining the inhibition percentages of the micelial growth and of conidial germination in the concentrations of 0, 1, 10 and 100 µg.mL<sup>-1</sup> of a.i.. The first through the method of the fungicide incorporation to the PDA growth medium and the second using the method of the cellophane paper described by NELLY (1978). The daily rates of growth were obtained through transfer of the strain for Petri's plates contend PDA growth medium, with daily mensurations of your growth. Pathogenicity to *Rosa* sp. was certain through the petals inoculation highlighted with a conidial suspension drop and posterior evaluation of the severity of the disease. The strains presented sensibility differentiated for the different evaluated criteria. Iprodione provided elevated inhibition levels of the growth micelial for all the isolated and tried concentrations. regarding conidium germination only two strains presented complete inhibition starting from 10 µg.mL<sup>-1</sup>, while other presented total germination in all studied concentrations. In general, isolated them less sensitive regarding conidial germination presented rates

inferior of growth and severity. The strains from strawberry, lisianthus and mango were pathogenic to *Rosa* sp.

**Key Words:** fungicide resistance, rose, gray mold, dicarboximide.

## INTRODUÇÃO

O fungo *Botrytis cinerea* encontra-se amplamente distribuído pelo mundo, sendo considerado patogênico a numerosas espécies de flores, frutos e hortaliças (HORST, 1983).

Em rosa, os sintomas manifestam-se em botões que ficam descoloridos não se abrindo normalmente tornando-se como que mumificados e pendentes. Sobre os mesmos, cresce um bolor acinzentado e pulverulento constituído de frutificações do fungo (TOFOLI *et al.* 2003). As infecções podem não ser visíveis durante a colheita mas se desenvolvem rapidamente em condições de umidade encontradas durante o armazenamento e transporte, onde os danos causados pelo fungo são mais severos (HORST, 1983).

Quanto ao desenvolvimento de resistência, *B. cinerea* apresenta características que o classificam como de alto risco: produção de grandes quantidades de conídios, que são facilmente disseminados e que apresentam grande variabilidade genética (GHINI & KIMATI, 2002). A ampla gama de hospedeiros do patógeno agrava ainda mais a situação, sendo muito provável que linhagens resistentes desenvolvidas em uma cultura possam ser patogênicos também às demais. PEARSON *et al.* (1980), mostraram que isolados resistentes a fungicidas obtidos de macieiras, feijoeiros e videiras foram considerados patogênicos em inoculações cruzadas.

A adaptabilidade de uma linhagem é definida como a habilidade do fungo de se desenvolver, reproduzir e sobreviver, comparada a outras linhagens nas mesmas condições. Pode ser avaliada, comparando-se com a linhagem selvagem quanto à capacidade de infectar a planta, colonizar os tecidos e

esporular, além de testes de competição (GHINI & KIMATI, 2002).

O fungicida iprodione, do grupo das dicarboximidas, foi introduzido em 1976 e possui conhecida ação botrítica, apresentando registro para as culturas de crisântemo, morango, pimentão e videira. É considerado de alto risco no tocante ao desenvolvimento de resistência, devido ao seu modo de ação específico. A intensa utilização deste princípio ativo, inclusive em culturas para as quais não apresenta registro, faz com que as populações de *B. cinerea* encontrem-se em constante pressão de seleção, tornando-se necessário um frequente monitoramento de seu nível de sensibilidade ao produto.

O objetivo do presente trabalho foi comparar linhagens de *B. cinerea* de diferentes hospedeiros, quanto à sensibilidade "in vitro" ao fungicida iprodione, à taxa de crescimento micelial e à capacidade de infectar e colonizar pétalas destacadas de *Rosa* sp..

## MATERIAL E MÉTODOS

As 6 linhagens de *B. cinerea* foram obtidas a partir de 4 culturas diferentes, 5 locais e em 3 épocas distintas, conforme descritos na Tabela 1. Os isolamentos foram feitos através da colocação em câmara úmida de amostras de material vegetal com sintomas da doença por 48 h, sob luz e temperatura ambientes, e posterior transferência de suas estruturas reprodutivas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Os isolados BC10 e BC11 foram fornecidos pela micoteca do Laboratório de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico.

A avaliação da sensibilidade ao fungicida iprodione foi feita através da determinação das porcentagens de inibição, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de i.a., do crescimento micelial e da germinação de conídios para cada linhagem. Para a primeira, foi utilizado o método da incorporação do fungicida ao meio de cultura de BDA fundente. Após seu resfriamento, discos de micélio de 0,4 cm de diâmetro foram repicados para o centro das placas em três

repetições e, posteriormente, foram mantidas em BOD por 4 dias sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de 24 °C. A avaliação foi realizada através da medição de dois diâmetros perpendiculares de cada colônia.

Para o experimento de inibição da germinação de conídios, foi utilizado o método do celofane descrito por NELLY (1978), onde 5 discos de papel celofane de 0,8 cm de diâmetro foram colocados em placas de Petri sobre 3 discos de papel de filtro embebidos em suspensão fungicida nas 4 concentrações acima descritas, em duas repetições. Posteriormente, uma gota de suspensão de conídios na concentração de  $10^5$  conídios/mL, foi depositada sobre cada disco de celofane. As placas assim preparadas foram mantidas em BOD sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de 24 °C. A avaliação foi feita em microscópio óptico após 24 h de incubação considerando-se como germinados, conídios que apresentassem tubo germinativo duas vezes maior que o seu diâmetro.

Para os dois experimentos, foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado.

Para a obtenção da taxa diária de crescimento micelial de cada isolado, discos de meio de cultura contendo micélio de 0,4 cm de diâmetro foram repicados

para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidos sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de 24°C. As avaliações foram feitas através de medições a intervalos de 24 h de dois diâmetros perpendiculares de cada colônia.

As capacidades de infectar e colonizar foram estudadas através da inoculação dos 6 isolados em pétalas de *Rosa* sp. Após serem destacadas, as pétalas foram colocadas em placas de Petri contendo 3 folhas de papel de filtro embebidos em água destilada, num total de 4 pétalas por placa, em duas repetições. Posteriormente, receberam uma gota de suspensão de conídios na concentração de  $10^5$  conídios/mL sendo transferidas para BOD e mantidas sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de 24 °C. Foram realizadas duas avaliações, aos 3 e 6 dias após a inoculação, utilizando-se como critério a porcentagem da superfície de cada pétala afetada pela doença.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira geral, os isolados apresentaram sensibilidade diferenciada para os diferentes critérios avaliados (Tabela 1 e Figura 1).

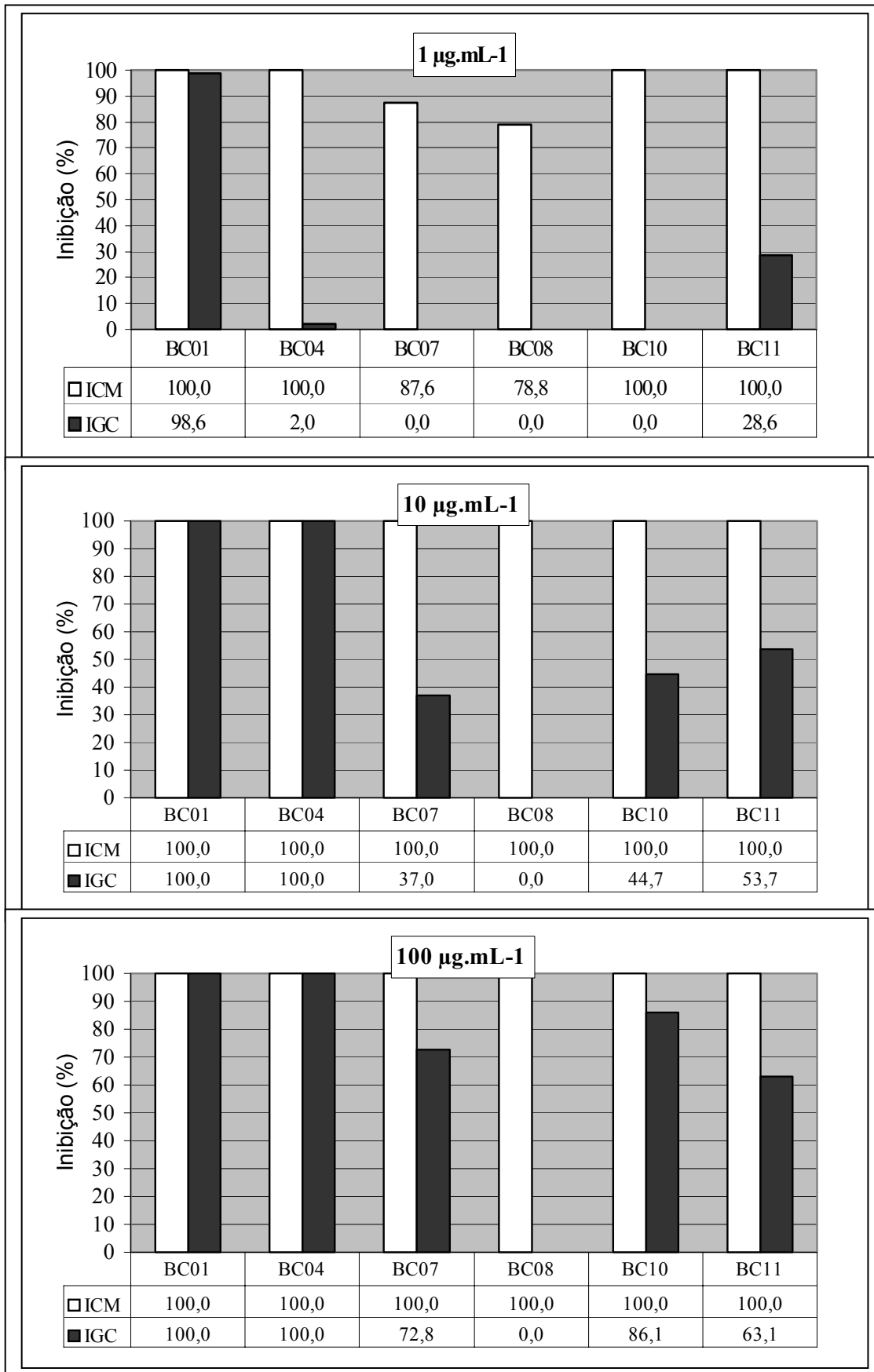
**Tabela 1.** Procedência, época do isolamento, hospedeiro, taxa de crescimento e área das pétalas de rosa afetadas para os seis isolados de *B. cinerea* avaliados.

Isolado	Procedência	Época	Hospedeiro	Taxa de Cresc. (cm/dia)	Área das Pétalas Afetadas (%)	
					3 DAI <sup>2</sup>	6 DAI
	Ambiente/Município			TCD <sup>1</sup>		
BC01	Jardim/São Paulo-SP	2002	rosa	3,29 a <sup>3</sup>	31,3	85,0
BC04	Campo/Extrema-MG	2002	morango	2,94 b	9,4	61,9
BC07	Estufa/Jacareí-SP	2002	lisianthus	2,71 b	0,0	23,1
BC08	Estufa/Jacareí-SP	2002	lisianthus	1,93 c	0,0	28,8
BC10	Campo/Jardinópolis-SP	1967	manga	2,63 b	73,1	100,0
BC11	Campo/Atibaia	1984	morango	2,68 b	19,4	56,3
CV (%)				6,48		

<sup>1</sup> TCD=Taxa de Crescimento Diário.

<sup>2</sup> DAI=Dias Após a Inoculação.

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.



**Figura 1.** Porcentagens de inibição do crescimento micelial (ICM) e da germinação de conídios (IGC) de *B. cinerea* pela ação de iprodione, nas concentrações de 1, 10 e 100 µg.mL<sup>-1</sup> de i.a.

Iprodione proporcionou elevados níveis de inibição do crescimento micelial para todos os isolados e concentrações testadas. Quanto à germinação de conídios apenas os isolados BC01 e BC04 apresentaram inibição completa a partir de 10 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto que BC08 apresentou germinação total em todas as concentrações estudadas. Os demais isolados apresentaram valores crescentes de inibição em função do aumento das concentrações de iprodione.

A maior taxa de crescimento diário foi obtida com o isolado BC01 e a menor com o BC08. Os demais isolados apresentaram valores intermediários de crescimento, não diferindo estatisticamente entre si. Todos os isolados foram capazes de infectar e colonizar pétalas de rosa destacadas, todavia com diferentes níveis de agressividade. Em geral, os isolados menos sensíveis quanto à germinação de conídios apresentaram taxas inferiores de crescimento e severidade, confirmando resultados de GHINI (1996) e KIMURA *et al.* (2001).

Os isolados BC01 e BC10 por sua origem e época de isolamento, são linhagens que não sofreram pressão de seleção por iprodione, apresentando portanto, elevada sensibilidade e adaptabilidade. Os demais, apesar de apresentarem elevada sensibilidade quanto ao critério inibição do crescimento micelial, apresentaram menor sensibilidade quanto à germinação de conídios, taxa de crescimento e patogenicidade, características típicas de linhagens com algum nível de resistência. Tais resultados sugerem que para iprodione, a porcentagem de inibição da germinação de conídios possa ser um critério de avaliação da resistência mais seguro que o de inibição do crescimento micelial.

Os resultados obtidos para os isolados BC07 e BC08 através de inoculações em pétalas de rosa destacadas, confirmam que linhagens que sofreram pressão de seleção pela utilização de fungicidas em outras culturas, podem se desenvolver e causar danos à cultura da *Rosa sp.*, em concordância com os resultados

obtidos por PEARSON *et al.* (1980), para as culturas da macieira, feijoeiro e videira.

#### LITERATURA CITADA

GHINI, R & KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 78 p, 2002.

GHINI, R. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. *Fitopatol. Bras.*21:285-288, 1996.

HORST, R, K. Compendium of roses diseases. Minnessota: Am. Phytopathol. Soc. 1983, 50p.

KIMATI, H. Controle Químico. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIN, L. (Eds.) *Manual de Fitopatologia. Vol. 1: Princípios e Conceitos.* São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 761-785.

KIMURA, M. K.; SOUZA, P. E.; CASTRO, H. A. Sensibilidade "in vitro" de *Botrytis cinerea* a fungicidas. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras [on line], v.25, n.5, p.1150-1160, 2001. Disponível em: [http://www.editora.ufra.br/revista/25\\_5/art14.pdf](http://www.editora.ufra.br/revista/25_5/art14.pdf). Acesso em: 31 julho 2003.

NELLY, D. Laboratory and greenhouse procedures methods for evaluation fungicides, nematicides and bactericides. Minnessota: Am. Phytopathol. Soc. 1978, 140p.

PEARSON, R. C.; ROSEMBERGER, D. A. ; SMITH, C. A. Benomyl resistant strain of *Botrytis cinerea* on apples, beans and grapes. *Plant Disease*, St. Paul, v.64, n.3, p.316-318, 1980.

TÖFOLI, J. G.; COUTINHO, L. N.; FIGUEIREDO, M. B.; RUSSOMANO, O. M. R.; DOMINGUES, R. J.; OLIVEIRA, S. H. F.. Doenças fúngicas e controle. In: IMENES, S. L. & ALEXANDRE, M. A. V. (Eds.) *Aspectos Fitossanitários da Roseira. Bol. Técn. Inst. Biol.* São Paulo, 2003. n. 13, p. 31-46.

