

OCORRÊNCIA DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS EM LINHAGENS DE *BOTRYTIS CINEREA*, NO ESTADO DE SÃO PAULO

RAQUEL GHINI*

EMBRAPA/CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

(Aceito para publicação em 13/03/96)

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

RESUMO

Isolados de *Botrytis cinerea* foram avaliados quanto a sensibilidade a benomyl, iprodione e propiconazole, através do método do fungicida incorporado ao meio de cultura de BDA. Os isolados de *B. cinerea* foram coletados em cultivos comerciais de cebola, berinjela, morango, crisântemo, batata e roseira, em diversas localidades do estado de S. Paulo. Em cultivos em estufa, foram obtidos isolados de roseira, ciclame, violeta, begônia, pimentão e cultivo hidropônico de tomate cereja. Os resultados demonstraram que está ocorrendo

uma redução na sensibilidade aos fungicidas testados, especialmente ao benomyl e iprodione, em condições de estufa, quando analisados os valores de ED₅₀ (dose do fungicida suficiente para inibir 50% do crescimento micelial) e CMI (concentração mínima inibitória). De modo geral, está ocorrendo uma redução na adaptabilidade das linhagens, avaliada através da taxa diária de crescimento micelial.

Palavras-chave: controle químico, resistência, benomyl, iprodione, propiconazole, adaptabilidade, fungo.

ABSTRACT

Occurrence of fungicide resistance on *Botrytis cinerea* strains, in the state of São Paulo

Isolates of *Botrytis cinerea* were evaluated with respect to their sensitivity to benomyl, iprodione and propiconazole, through the method of fungicide incorporation in PDA growth medium. The *B. cinerea* isolates were collected on commercial plantations of onion, eggplant, strawberry, chrysanthemum, potato, and rose, in different localities of the state of São Paulo. Under greenhouse commercial plantations, isolates were obtained from rose, cyclamen, violet, begonia, sweet pepper and hydroponically grown tomato.

The results showed that there is a reduction in the strains sensitivity to the fungicides tested, especially to benomyl and iprodione, under greenhouse conditions. Such reduced sensitivity was expressed as increases in the ED₅₀ (fungicide dose enough to inhibit 50% of mycelial growth) and MIC (minimal inhibitory concentration). In general, there was a reduction in these strains fitness as evaluated by their mycelial growth rate.

INTRODUÇÃO

A espécie *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. é patogênica a uma ampla gama de hospedeiros, que inclui importantes

hortaliças e plantas ornamentais, tanto em cultivos em estufas, quanto em campos (Coley - Smith *et al.*, 1980). A doença pode ocorrer em quase todos os estádios de desenvolvimento da planta, sendo que o uso de fungicidas, na maior parte dos casos, constitui-se na única alternativa viável de controle. Assim, as populações de *B. cinerea* estão cons-

* Bolsista do CNPq.

tantemente expostas à ação de fungicidas específicos, favorecendo a seleção de linhagens resistentes.

Além disso, as características do patógeno permitem o desenvolvimento de resistência. Segundo Dekker & Georgopoulos (1982), além da pressão de seleção e da adaptabilidade da linhagem resistente, a velocidade de surgimento do problema da resistência de fungos a fungicidas depende do tipo de doença, da natureza do patógeno e das circunstâncias que promovem ou dificultam o desenvolvimento da resistência. Entre esses fatores estão: a) capacidade de multiplicação e disseminação do patógeno, visto que o surgimento de resistência deve ser mais rápido em patógenos com intensa esporulação em partes aéreas da planta do que em patógenos que esporulam pouco ou produzem esporos que não são facilmente transportados, como pode ser o caso de vários patógenos de raízes; b) sobrevivência da linhagem sensível, pois durante os períodos de reduzida pressão de seleção, esta linhagem poderá competir com a linhagem resistente; c) limiar de infecção da doença, já que com doenças com um alto limiar de infecção, o surgimento de uma célula mutante raramente resultará em infecção, assim o risco de desenvolvimento de resistência na população é baixo; d) células multi-nucleadas, visto que genes que conferem resistência em fungos multi-nucleados podem, sob pressão de seleção do fungicida, ter sua frequência rapidamente aumentada na população do patógeno, como nos fungos heterocarióticos; e) severidade da epidemia. No caso, *B. cinerea* produz, geralmente, grandes quantidades de conídios, que são facilmente disseminados, e que apresentam grande variabilidade genética devido à ocorrência de heterocariose, decorrente do grande número de núcleos por conídio (Coley-Smith *et al.*, 1980).

Como resultado, diversos casos de resistência de *B. cinerea* a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas foram relatados em diversos países (Dekker & Georgopoulos, 1982; Delp, 1988). No Brasil, foi relatada a ocorrência de linhagens de *B. cinerea* resistentes a benomyl nas culturas de morango (Cabrin & Kimati, 1986), eucalipto (Ghini & Krugner, 1987), roseira (Mosca *et al.*, 1989) e berinjela (Ghini, 1990).

A resistência de fitopatógenos a fungicidas é um dos mais importantes problemas do controle químico de doenças de plantas. Muitos produtos altamente eficientes, que constituem, em diversos casos, a única alternativa viável de controle de um patógeno, podem estar em processo de seleção para resistência. Esse processo pode se desenvolver rapidamente e levar a problemas irreversíveis. Assim sendo, o monitoramento da resistência se faz necessário, juntamente com a avaliação da sensibilidade colateral dos isolados a fungicidas de outros grupos químicos (Delp, 1988).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência de resistência a fungicidas e a adaptabilidade, através do crescimento micelial, de linhagens de *B. cinerea* coletadas em diferentes culturas e períodos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *B. cinerea* foram coletados em diversas culturas, períodos e localidades do estado de São Paulo (Ta-

bela 1). Para a obtenção dos isolados, o material vegetal infectado pelo patógeno foi colocado em câmara úmida (placa de Petri com dois discos de papel filtro umedecidos com água destilada) e submetido a 20° C e fotoperíodo de 12 horas. A luminosidade foi conferida por uma lâmpada fluorescente luz do dia e uma próxima ao ultravioleta (NUV). Após 24 horas de incubação, as estruturas do patógeno foram transferidas para meio de cultura de BDA e, a seguir, preservadas em água, segundo o método de Castellani, descrito por Figueiredo (1967).

A taxa diária de crescimento micelial foi obtida transferindo-se discos de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro) contendo núcleo dos isolados para meio de cultura de BDA, em 3 repetições. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados. Diariamente foram avaliados 4 raios perpendiculares das colônias, mantidas no escuro, a 20° C.

Para a determinação do ED₅₀ (dose do fungicida suficiente para inibir 50% do crescimento micelial) e do CMI (concentração mínima inibitória), foi utilizado o método do fungicida incorporado ao meio de cultura. Para tanto, os isolados foram repicados para meio de cultura de BDA contendo 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm de benomyl, iprodione e propiconazole, de forma semelhante à descrita para a avaliação da taxa de crescimento. Para os cálculos do ED₅₀, usou-se estimativas de máxima verossimilhança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos isolados de *B. cinerea* coletados, observa-se que houve um acentuado aumento nos valores de ED₅₀ para benomyl (Tabela 1). Considerando-se o valor de ED₅₀ de 70 ppm de benomyl como indicador de resistência em testes de rotina, conforme estabelecido por Moorman & Lease (1992), a partir de 1989, somente três isolados poderiam ser considerados sensíveis (14, 15 e 20).

Para iprodione também foram observados aumentos nos valores de ED₅₀, além de uma ligeira alteração na sensibilidade a propiconazole, refletida por maiores valores de CMI. Comparando-se os resultados obtidos com as categorias de sensibilidade utilizadas por Latorre *et al* (1994), onde os isolados com baixo nível de resistência apresentam ED₅₀ entre 2 e 10 ppm de iprodione, os altamente resistentes > 10 ppm, os sensíveis < 2 ppm e os altamente sensíveis ≤ 0,5 ppm, verifica-se que os isolados que apresentavam-se sensíveis ou altamente sensíveis estão sendo substituídos por linhagens com baixo nível de resistência (isolados 22, 27 e 28) ou altamente resistentes (isolado 23).

De modo geral, os isolados coletados recentemente apresentaram crescimento micelial com menores taxas diárias do que os coletados anteriormente (Tabela 1). Sendo a taxa de crescimento micelial um dos parâmetros utilizados para a avaliação de adaptabilidade, os resultados sugerem que houve uma redução de adaptabilidade dos isolados de *B. cinerea*.

Na maioria dos relatos, a resistência a benzimidazóis não está ligada a uma redução da adaptabilidade e se mantém estável por longos períodos, mesmo na ausência do fungicida (Delp, 1988). Moorman & Lease (1992) não encontraram diferenças significativas na taxa de crescimento diário de

TABELA 1 - Taxa média de crescimento diário e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea*.

Isolado	Hospedeiro	Local	Ano	Taxa de crescimento (cm/dia) ⁴	ED ₅₀ (ppm) ⁵			CMI (ppm) ⁶		
					Benomyl	Iprodione	Propiconazole	Benomyl	Iprodione	Propiconazole
1	cebola	Piracicaba	1982	1,92 gh	< 1	< 1	— ³	10	10	—
2	berinjela	Piracicaba	1983	3,64 abc	< 1	< 1	—	100	100	—
3	morango	Atibaia	1988	3,82 ab	42,2 ± 7,2	< 1	—	> 1000	100	—
4	morango	Atibaia	1988	3,59 abcd	< 1	< 1	—	10	1000	—
5	morango	Atibaia	1988	3,90 ab	94,2 ± 21,3	< 1	—	> 1000	100	—
6	morango	Atibaia	1988	3,80 ab	178,3 ± 51,4	< 1	—	> 1000	100	—
7	crisântemo	Holambra	1988	3,98 a	11,9 ± 2,1	< 1	—	> 1000	100	—
8	roseira	Holambra ¹	1989	2,75 cdefgh	142,1 ± 25,9	< 1	—	> 1000	10	—
9	roseira	Holambra ¹	1989	2,47 fgh	143,2 ± 26,1	< 1	—	> 1000	10	—
10	roseira	Holambra ¹	1989	2,78 cdefg	225,0 ± 48,0	< 1	—	> 1000	10	—
11	berinjela	Registro	1989	2,98 bcdef	189,5 ± 55,2	< 1	—	> 1000	100	—
12	morango	Jaguariúna	1990	1,89 gh	184,8 ± 59,1	—	—	> 1000	—	—
13	batata	Divinolândia	1990	1,94 gh	331,5 ± 128,7	< 1	—	> 1000	10	—
14	ciclame	Atibaia ¹	1990	4,04 a	10,9 ± 3,4	< 1	—	> 1000	10	—
15	ciclame	Atibaia ¹	1990	4,00 a	55,5 ± 10,4	< 1	—	> 1000	10	—
16	violeta	Holambra ¹	1991	2,12 fgh	208,9 ± 23,4	< 1	—	> 1000	10	—
17	violeta	Holambra ¹	1991	2,04 gh	469,3 ± 51,5	< 1	—	> 1000	10	—
18	roseira	Holambra	1992	2,44 fgh	450,1 ± 69,5	< 1	< 1	> 1000	100	10
19	morango	Campinas	1992	2,28 fgh	279,7 ± 74,0	< 1	< 1	> 1000	10	10
20	tomate cereja	Vargem Grande Paulista ²	1992	3,49 abcde	< 1	< 1	< 1	1	1	10
21	violeta	Holambra ¹	1992	2,72 defgh	> 1000	< 1	< 1	> 1000	100	10
22	begônia	Holambra ¹	1992	2,74 cdefgh	> 1000	2,8 ± 0,3	< 1	> 1000	100	10
23	pimentão	Itapeccerica da Serra ¹	1992	2,60efgh	825,1 ± 61,9	17,7 ± 8,2	< 1	> 1000	> 1000	100
24	roseira	Holambra	1992	2,45 fgh	503,6 ± 116,6	< 1	1,2 ± 0,1	> 1000	100	100
25	roseira	Holambra	1993	2,07 fgh	> 1000	1,3 ± 0,1	< 1	> 1000	100	100
26	roseira	Holambra	1993	2,01 gh	354,9 ± 169,2	1,2 ± 0,3	< 1	> 1000	100	100
27	begônia	Holambra ¹	1994	1,85 h	150,9 ± 25,9	2,3 ± 0,3	< 1	> 1000	100	10
28	violeta	Holambra ¹	1994	2,23 fgh	393,1 ± 124,1	3,2 ± 0,4	< 1	> 1000	100	10

¹ Cultivo em estufa² Cultivo hidropônico³ Não testado⁴ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.⁵ ED₅₀ = dose do fungicida (ppm) para inibir 50% do crescimento micelial.⁶ MCI = concentração mínima inibitória (ppm), sendo que para sua determinação foram testadas as doses de 1, 10, 100 e 1000 ppm dos fungicidas incorporados em meio de cultura de BDA.

linhagens de *B. cinerea*, coletadas em estufas, resistentes e sensíveis a dicarboximidazóis e benzinidazóis.

Para os fungicidas dicarboximidazóis e os inibidores da biossíntese do ergosterol, de modo geral, observa-se na maioria dos relatos uma menor adaptabilidade das linhagens resistentes (Delp, 1988). Para Pommer & Lorenz (1982), apesar de não terem sido relatados sérios prejuízos com o surgimento de resistência aos dicarboximidazóis em condições

de campo, uma situação diferente parece estar ocorrendo em culturas em estufas. Hartill *et al.* (1983) explicam que a barreira física da estufa impede a entrada de conídios, fazendo com que a competição entre as linhagens não seja tão intensa quanto fora da estufa. Assim, uma vez que a população resistente se desenvolveu na estufa, mesmo apresentando baixa adaptabilidade, ela pode ser mais estável do que uma população similar em condições de campo. De fato, os isola-

dos de *B. cinerea* com algum nível de resistência a iprodione foram obtidos em cultivos em estufa (Tabela 1, isolados 22, 23, 27 e 28).

Um isolado duplo-resistente a benomyl e iprodione foi obtido num cultivo de pimentão em estufas, em Itapeccerica da Serra/SP, resultando em perda de eficiência dos dois fungicidas (Tabela 1, isolado 23). Problemas semelhantes foram observados por Leroux & Clerjeau (1985), Gullino & Garibaldi (1981), Northover & Matteoni (1986) e Moorman & Lease (1992). No Brasil, Ghini & Kimati (1990) obtiveram *in vitro* uma linhagem de *Botrytis squamosa* duplo-resistente, porém apresentando menor adaptabilidade. No presente trabalho, possivelmente a alta pressão de seleção exercida pelo uso intenso dos dois fungicidas, o caráter epidêmico da doença e as condições ambiente favoráveis à sobrevivência de linhagens, incluindo as menos adaptadas, permitiram o aparecimento da dupla-resistência.

Por outro lado, o isolado 20, obtido num cultivo hidropônico de tomate cereja, apresentou-se sensível aos fungicidas testados e uma relativamente alta taxa de crescimento diário. O fato de benomyl não ter sido aplicado, e os outros fungicidas serem pouco utilizados nesse cultivo de Vargem Grande Paulista/SP, não promoveu uma pressão de seleção em favor de linhagens resistentes, permitindo a sobrevivência das sensíveis.

Via de regra, quando os problemas com resistência ocorrem, as linhagens resistentes a um determinado fungicida são resistentes aos outros produtos do mesmo grupo químico, isto é, apresentam resistência cruzada, visto que compartilham de um mesmo modo de ação (Dekker & Georgopoulos, 1982). No presente trabalho, apesar de não registrados para algumas culturas, foram estudados fungicidas pertencentes a três diferentes grupos (benzimidazóis, dicarboximidas e triazóis), que podem apresentar sérios problemas de perda de eficiência se não forem adotadas estratégias anti-resistência.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece à assistente de pesquisa Mara Denise Luck Mendes pelo auxílio na condução dos experimentos em laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABRINI, H.M. & KIMATI, H. Ocorrência de isolados de *Botrytis cinerea* Pers ex Fr. resistentes a benomyl em morangos (*Fragaria* spp.) no estado de São Paulo. *Summa Phytopathol.* 12: 16. 1986.
- COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W.R. The biology of *Botrytis*. London, Academic Press, 1980. 318 p.
- DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S.G. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. 265 p.
- DELPE, C.J. Fungicide resistance in North America. St. Paul, APS Press, 1988. 133 p.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para a conservação de fungos patogênicos em plantas. *O Biológico* 33: 9-13. 1967.
- GHINI, R. Ocorrência e sensibilidade colateral de linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes a benzimidazóis em berinjela, em Registro, SP. *Summa Phytopathol.* 16: 36. 1990.
- GHINI, R. & KIMATI, H. Adaptabilidade de linhagens de *Botrytis squamosa* resistentes a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas. *Summa Phytopathol.* 16: 253-262. 1990.
- GHINI, R. & KRUGNER, T.L. Ocorrência de *Botrytis cinerea* resistente a benomyl em viveiro de *Eucalyptus viminalis*, em Três Barras, SC. *Summa Phytopathol.* 13: 36. 1987.
- GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. Competition *in vitro* and *in vivo* between strains of *Botrytis cinerea* Pers. sensitive and resistant to dicarboximides. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 87: 243. 1981.
- HARTILL, W.F.T.; TOMPKINS, G.R.; KLEINSMAN, P.J. Development in New Zealand of resistance to dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*, to acylalimines in *Phytophthora infestans*, and to guazatine in *Penicillium italicum*. *New Zealand Journal of Agriculture Research* 26: 261-269. 1983.
- LEROUX, P. & CLERJEAU, M. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt) Berl. and de Toni to fungicides in french vineyards. *Crop Protection* 4: 137-160. 1985.
- LATORRE, B.A.; FLORES, V.; SARA, A.M. Dicarboximide-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: survey and characterization. *Plant Dis.* 78: 990-994. 1994.
- MOORMAN, G.W. & LEASE, R.J. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant Dis.* 76: 477-480. 1992.
- MOSCOSO, J. : GHINI, R.; ROBBS, C.F. Ocorrência e sensibilidade colateral de linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes a benzimidazóis em roseiras em estufas, no estado de São Paulo. *Fitopatol. bras.* 14: 148. 1989.
- NORTHOVER, J. & MATTEONI, J.A. Resistance of *Botrytis cinerea* to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to fungicides alone or mixed with captan. *Plant Dis.* 70: 398-402. 1986.
- POMMER, E.H. & LORENZ, G. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides - a literature review. *Crop Protection* 1: 221-230. 1982.