

ERACLIDES MARIA FERREIRA

**FUNGICIDAS SISTÊMICOS PARA O CONTROLE DE *Cylindrocladium*  
*candelabrum* E *Quambalaria eucalypti* EM MUDAS CLONAIAS DE  
EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005**

ERACLIDES MARIA FERREIRA

**FUNGICIDAS SISTÊMICOS PARA O CONTROLE DE *Cylindrocladium*  
*candelabrum* E *Quambalaria eucalypti* EM MUDAS CLONAIAS DE  
EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 29 de junho de 2005.

---

Prof. Luiz Antônio Maffia  
(Conselheiro)

---

Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias  
(Conselheiro)

---

Dr. Douglas Lau

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

---

Prof. Acelino Couto Alfenas  
(Orientador)

Aos meus pais Verônica e Euclides.

Aos meus irmãos Evander, Elivelton e Eliza.

## **DEDICO**

*“Se algo pode ser melhorado, quanto mais cedo melhor!”*

Management Memorandum – The Economic Press

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso de graduação e mestrado e pela moradia concedida durante a graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa.

Ao professor Acelino Couto Alfenas pela confiança, paciência, orientação, incentivos e ensinamentos durante a graduação e o mestrado.

À empresa Aracruz Celulose e Cenibra S.A. pelo fornecimento de material vegetal e apoio na montagem dos experimentos.

Ao Luiz Antônio dos Santos Dias e ao professor Luiz Antônio Maffia pelas sugestões e conselhos.

Ao professor Francisco Alves Ferreira pela amizade.

Aos amigos Reginaldo e Aderlan pelo convívio e amizade.

Ao Eneir e Fizinho pela grande ajuda durante a montagem dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia: Elói, Délio, Camilo, Brás e Jésus, pela convivência amigável.

Aos colegas do laboratório de Patologia Florestal: Edival, Márcia, Renildo, Sorahia, Márcio, Daniel, Rafael, Talyta, Carolina e Zeca pela convivência.

A todos os colegas que conheci durante desde a graduação, no laboratório de Patologia Florestal: Débora, Riva, Sandra, Eugênio, Marcelo Laia, Rogério, Diogo,

Danival, Vanda, Nozinho, César, Adelica, Lisiene, Leandro, Gabriela, Fausto, Ernesto, Mário, Jeane, Juliana, Adelita, Elisângela, Pablo, Fernando, Paulão, Sílvia, Adriano, Luciano, Daniela, Irislei, Rafaela, Michelle, Vinícius, Alex e Denis.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos valiosos ensinamentos para minha formação.

Aos colegas de mestrado pela convivência durante as disciplinas.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Eraclides Maria Ferreira, filha de Verônica Alves Ferreira e Euclides José Ferreira, nasceu em Silveirânia, Minas Gerias, em 14 de novembro de 1974.

Em 1997, ingressou no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Foi bolsista de iniciação científica no laboratório de Nematologia e no laboratório de Patologia Florestal de 1998 a 2002. Nesse período, realizou trabalhos sob orientação da professora Rosângela D’Arc de Oliveira e do professor Acelino Couto Alfenas. Colou grau em maio de 2002.

Em abril de 2004, iniciou o programa de pós-graduação em Fitopatologia na mesma Universidade, sob orientação do professor Acelino Couto Alfenas, na área de Patologia Florestal. Em julho de 2005 defendeu a tese de mestrado.

## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
ARTIGO 1.....	6
Fungicidas sistêmicos: efetividade protetora, curativa e anti-esporulante para <i>Cylindrocladium candelabrum</i> , translocação e persistência em plantas de eucalipto .....	6
<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
<b>Fungicidas e concentrações testadas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>Eficiência dos fungicidas em plantas de eucalipto .....</b>	<b>9</b>
<b>Efeito protetor .....</b>	<b>10</b>
<b>Efeito curativo .....</b>	<b>10</b>
<b>Efeito dos fungicidas sobre a expansão de lesões .....</b>	<b>11</b>
<b>Efeito anti-esporulante.....</b>	<b>11</b>
<b>Atividade translaminar.....</b>	<b>12</b>
<b>Persistência .....</b>	<b>12</b>

<b>Delineamento experimental e análises estatísticas .....</b>	<b>12</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
<b>Efetividade <i>in vitro</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>Efeito protetor .....</b>	<b>14</b>
<b>Efeito dos fungicidas sobre a expansão das lesões.....</b>	<b>14</b>
<b>Efeito curativo .....</b>	<b>14</b>
<b>Efeito anti-esporulante.....</b>	<b>14</b>
<b>Atividade translaminar.....</b>	<b>15</b>
<b>Persistência .....</b>	<b>15</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>19</b>
<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>27</b>
<b>Fungicidas sistêmicos para o controle de <i>Quambalaria eucalypti</i> e seus efeitos na produção de miniestacas de eucalipto para enraizamento.....</b>	<b>27</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>27</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Efetividade <i>in vitro</i> dos fungicidas .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Eficiência dos fungicidas em plantas de eucalipto .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3. Efeito de fungicidas sobre a capacidade produtiva de minicepas e sobre o crescimento de mudas de eucalipto.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Efetividade <i>in vitro</i> de fungicidas .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Eficiência dos fungicidas em plantas de eucalipto .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3. Efeito de fungicidas sobre a capacidade produtiva de minicepas e sobre o crescimento de mudas de eucalipto.....</b>	<b>36</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>50</b>

## RESUMO

FERREIRA, Eraclides Maria, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2005.  
**Fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* e *Quambalaria eucalypti* em mudas clonais de eucalipto.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Luiz Antônio Maffia e Luiz Antônio dos Santos Dias.

O controle de doenças em viveiros é feito, principalmente, por meio de técnicas de manejo que visam reduzir as fontes de inóculo e as condições favoráveis à infecção. Excepcionalmente, a aplicação de fungicidas pode constituir uma alternativa complementar de controle. Tendo em vista a escassez de estudos sobre a efetividade de fungicidas para o controle de *C. candelabrum* e *Q. eucalypti*, avaliou-se, neste trabalho, o efeito protetor, curativo e anti-esporulante, a translocação e a persistência em plantas de eucalipto bem como seus efeitos sobre a produção de brotos e enraizamento de miniestacas. Dentre os nove produtos testados *in vitro*, azoxystrobin, epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin, pyraclostrobin e tebuconazole destacaram-se como os mais efetivos. Subseqüentemente, esses fungicidas foram testados em mudas de eucalipto sob condições controladas.

Epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e tebuconazole apresentaram efeito protetor, curativo e anti-esporulante para *C. candelabrum* e *Q. eucalypti*. Esses princípios ativos apresentaram atividade translaminar e persistência nos tecidos foliares por um período de 10 a 15 dias. Nos experimentos em minijardim clonal, utilizaram-se sete fungicidas em diferentes concentrações. Dentre os produtos testados, somente epoxiconazole+pyraclostrobin exibiu efeito fitotóxico, reduzindo a produção de miniestacas, o enraizamento e a biomassa radicular em um dos clones testados. O resultados deste trabalho permitem concluir que epoxiconazole e tebuconazole são fungicidas os mais indicados para o controle de *C. candelabrum* e *Q. eucalypti*. Além de sua eficiência relativamente alta, não foram fitotóxicos e apresentarem atividade protetora, curativa, translocação translaminar e persistência média de 15 dias em plantas de eucalipto.

## ABSTRACT

FERREIRA, Eraclides Maria, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June, 2005.  
**Systemic fungicides for the control of *Cylindrocladium candelabrum* and *Quambalaria eucalypti* in plants of eucalyptus**. Advisor: Acelino Couto Alfenas.  
Committee Members: Luiz Antônio Maffia and Luiz Antônio dos Santos Dias.

Disease control in nurseries is normally based on management techniques aimed at eradicating sources of inoculum and reducing conditions that favor infection. Application of fungicides may be used as a complementary control measure in exceptional cases. Given the scarcity of studies on effectiveness of fungicides for control of *C. candelabrum* and *Q. eucalypti*, in this study the protective, curative and anti-sporulating effect, the translocation and persistence of fungicides in eucalypt plants as well as their effect on seedling production and mini-cutting root development were evaluated. Among the nine products tested *in vitro*, azoxystrobin, epoxiconazol, epoxiconazol+pyraclostrobin, pyraclostrobin and tebuconazol were the most effective. Subsequently, these fungicides were tested in eucalypt seedlings under controlled conditions. Epoxiconazol, epoxiconazol+pyraclostrobin and

tebuconazol presented protective effect, curative and anti-sporulating effects against *C. candelabrum* and *Q. eucalypti*. These active ingredients presented translaminar activity and persisted in leaf tissue for 10 to 15 days. Seven fungicides at different concentrations were evaluated in a clonal mini-hedge experiment. Among the products tested, only epoxiconazol+pyraclostrobin exhibited a phytotoxic effect, resulting in reduced mini-cutting production, root development and root biomass in one of the eucalypt clones tested. Based on the results of this study, it can be concluded that epoxiconazol and tebuconazol are the most appropriate fungicides for control of *C. candelabrum* and *Q. eucalypti*. They had a relatively high control efficiency, were not phytotoxic and presented relatively high protective and curative activity as well as translaminar translocation and persisted on average for 15 days in eucalypt plants.

## INTRODUÇÃO GERAL

A produção de mudas de eucalipto no Brasil é feita principalmente por estaquia, na qual pode ser dividida em 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). Para a produção de brotações, minicepas clonais são mantidas em canaletões suspensos, preenchidos com areia com fertirrigação por gotejamento, ou em tanques de hidroponia, com inundação temporária. Com o advento da técnica de miniestaquia, tem-se conseguido uma redução significativa de incidência de doenças em todas as fases da propagação clonal de *Eucalyptus* spp. Não obstante, tem-se observado surtos esporádicos de *Quambalaria eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart) Simpson, *Puccinia psidii* Winter e *Oidium eucalypti* Rostr. em minijardins clonais. Dentre os patógenos que incidem em minicepas clonais, merece destaque *Q. eucalypti*, tendo em vista seu recente relato no Brasil e seu potencial de danos na fase de produção de brotações (Alfenas et al., 2004). *Q. eucalypti* causa manchas foliares e anelamento de hastes de mudas e minicepas clonais. A doença caracteriza-se por lesões marrons claras na superfície adaxial e abaxial do limbo foliar. Entretanto, as lesões da superfície abaxial são comumente recobertas por esporulação branca e pulverulenta. A esporulação seca e intensa torna o patógeno de fácil dispersão pelo vento e pelas

ferramentas de poda que são utilizadas nas coletas das brotações em minicepas de eucalipto. A infecção se dá na haste principal de mudas e de porções apicais de brotações de minicepas e em folhas (Alfenas et al., 2004). Isso ocorre porque no minijardim, em geral há condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, como altas temperaturas, além dos ferimentos que ocorrem durante as podas e/ou colheita freqüente de brotações.

Nas fases de aclimatação à sombra, crescimento e rustificação a céu aberto, tem sido freqüente a incidência de canela preta e manchas foliares causadas por *Cylindrocladium* spp., principalmente *C. candelabrum* Viégas. Os sintomas se caracterizam por lesões pequenas, circulares e arroxeadas, distribuídas sobre o limbo foliar. O anelamento de hastes ou canela preta provoca lesões escuras no caule (Alfenas et al., 2004). A associação de vários fatores, dentre eles desbalanço nutricional (Ferreira & Milani, 2002) e espaçamento inadequados das mudas, favorecem a doença. Nessa fase, recomenda-se aumentar o espaçamento para minimizar a ocorrência de patógeno e reduzir as aplicações de fungicidas. Todavia, períodos prolongados de chuva tornam o ambiente favorável a infecção, havendo a necessidade de aplicações de fungicidas como alternativa complementar de controle (Alfenas et al., 2004).

Há, contudo, escassez de estudos sobre a eficiência de fungicidas contra esses patógenos. Embora alguns estudos com fungicidas como benomyl, thiram, captan, chlorotalonil, iprodione, PCNB, thiofanato metílico, triadimenol, dentre outros tenham sido realizados contra patógenos em eucalipto (Ruiz, 1988; Ferreira, 1989; Silveira, 1996; Zauza et al., 2003), outros fungicidas com amplo espectro de ação, com efeito, protetor e curativo, foram disponibilizados no mercado, destacando-se as classes das estrobilurinas e dos triazóis. Estrobilurinas são análogos a produtos naturais produzidos por espécies de fungos lignolíticos dos gêneros *Strobilurus*, *Oudemansiella* e *Mycena*, encontradas naturalmente em florestas tropicais e temperadas (Anke, 1995; Ypema & Gold, 1999; Leroux, 2003; Wong & Wilcox, 2003; Karadimos et al., 2005). Já os triazóis são produtos sintéticos com alta eficiência no controle de vários patógenos em culturas agrônômicas (Gisi et al., 2002; Schnabel & Dai, 2004), desde a década de 70 (Zambolim et al., 2003).

São muitos os efeitos desses compostos no crescimento e desenvolvimento de plantas (Gao et al., 1988; Ypema & Gold, 1999) e com o potencial fungicida (Buchenauer & Rohner, 1981; Fletcher & Nath, 1984; Mita & Shibaoka, 1984; Fletcher et al., 1986; Gao et al., 1988, Ypema & Gold, 1999). As propriedades reguladoras de crescimento e fungicidas são de interesse para produção de brotações em minicepas, bem como no controle de doenças que ocorrem constantemente nos viveiros clonais, particularmente em minijardins.

Portanto, na primeira parte desse trabalho, objetivou-se selecionar fungicidas sistêmicos mais efetivos para o controle de doenças causadas por *C. candelabrum* em viveiros de eucalipto e determinar os efeitos protetores, curativos e anti-esporulantes dos fungicidas, bem como sua translocação e persistência em plantas de eucalipto. Na segunda parte procurou-se, verificar a efetividade protetora, curativa e anti-esporulante de fungicidas para *Q. eucalypti* em plantas de eucalipto e estudar o efeito das moléculas no crescimento e desenvolvimento de minicepas e miniestacas de eucalipto.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa. UFV. 2004. 442p.
- ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. Canadian Journal of Botany. 73:S940-S945.1995.
- BUCHENAUER, H. & ROHNER, E. Effect of triadimefon and triadimenol on various plant species as well as on gibberellin content and sterol metabolism on shoots of barley seedlings. Pesticide Biochemistry and Physiology. 15:58-70. 1981.
- FERREIRA, F.A. & MILANI, D. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogi Guaçu, SP: International Paper. 2002. 98p.
- FERREIRA, F.A. Patologia Florestal. Principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, SIF. MG-Brasil. 1989. 570p.

- FLETCHER, R.A. & NATH, V. Triadimefon reduces transpiration and increases yield in water stressed plants. *Plant Physiology*. 69:422-426. 1984.
- FLETCHER, R.A., HOFSTRA, G. & GAO, J. Comparative fungitoxic and plant growth regulating properties of triazole derivatives. *Plant and Cell Physiology*. 27:367-371. 1986.
- GAO, J., HOFSTRA, G. & FLETCHER, R.A. Anatomical changes induced by triazoles in wheat seedlings. *Canadian Journal of Botany*. 66:1178-1185. 1988.
- 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.
- LEROUX, P. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus Biologies*. 326:9-21. 2003.
- MITA, T. & SHIBAOKA, H. Effects of S-3307, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, on swelling of leaf sheath cells and on the arrangement of cortical microtubules in onion seedlings. *Plant and Cell Physiology*. 25:1531-1539. 1984.
- RUIZ, R.A.R. Epidemiologia e controle químico da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto. Viçosa, MG:UFV, 1988. (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. 1988.
- SCHNABEL, G. & DAI, Q. Heterologous expression of the P450 sterol 14 **a**-demethylase gene from *Monilinia fructicola* reduces sensitivity to some but not all DMI fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 78:31-38. 2004.
- SILVEIRA, S.F. Etiologia e controle da mela de estacas e da queima de folhas de eucalipto causadas por *Rhizoctonia* spp. Viçosa. MG:UFV, 1996. (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. 1996.

- 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.
- ZAMBOLIM, L., CONCEIÇÃO, M.Z. & SANTIAGO, T. O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Viçosa: UFV. 2003. 376p.
- 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).

## ARTIGO 1

### **Fungicidas sistêmicos: efetividade protetora, curativa e anti-esporulante para *Cylindrocladium candelabrum*, translocação e persistência em plantas de eucalipto**

#### 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, há escassez de 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, sua translocação e persistência em plantas de eucalipto. Nos experimentos *in vitro* utilizaram-se: 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* (*E. 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  $10^5$  conídios/ml. 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, que também apresentaram atividade translaminar e persistência nos tecidos foliares.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a maioria das empresas eucaliptocultoras no Brasil utiliza a clonagem por miniestaquia. 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* (Wingfield, Crous & Swart) Simpson, *Cylindrocladium* spp., *Puccinia psidii* 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. ex Fr, *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 eucalipto 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 (Amistar 500 WG), triadimenol (Bayfidan CE), boscalid (Cantus WG), pyraclostrobin (Comet CE), carbendazim (Derosal 500 SC), tetraconazole (Domark 100 CE), tebuconazole (Folicur 200 CE), epoxiconazole +pyraclostrobin (Opera CE) e epoxiconazole (Opus CE). 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 foram obtidas a partir de colônias em crescimento com esporulação em meio BDA (Batata, dextrose e ágar), 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  $2 \times 10^4$  conídios/ml. Após homogeneização, 50  $\mu$ L da suspensão foram pipetados para lâmina 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  $\mu$ g 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 suspensão 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  $\mu$ M de fótons/m<sup>2</sup>/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 1g de superfosfato simples por litro da mistura. As mudas foram mantidas em casa-de-vegetação por 20-30 dias e, semanalmente, foram adubadas com

nutriente tipo Ouro verde<sup>®</sup>. As plantas foram inoculadas com suspensão de  $10^5$  conídios/ml.

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 foram 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.

### **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). Após sete dias da inoculação do patógeno e cinco da aplicação dos fungicidas, a partir de quatro folhas totalmente expandidas, previamente marcadas, foram retirados cinco fragmentos/folha das bordas das lesões a fim de avaliar a sobrevivência do patógeno. Para isso, os fragmentos foram colocados 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. 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). As plantas 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, coletaram-se dois pares de folha de cada repetição e quantificou-se a área lesionada (cm<sup>2</sup>) com o auxílio do programa Quant<sup>®</sup> (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, das folhas lesionadas retiraram-se discos de 3 mm de diâmetro. Os discos foram colocados em tubos de ensaio com 5 ml de água destilada esterilizada, que foram agitados para liberação dos esporos e posteriormente 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, na superfície abaxial da folha, inoculou-se o patógeno. 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.

## **Persistência**

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 e 30 dias as plantas foram inoculadas e, subsequentemente, transferidas para casa-de-vegetação. Após cinco dias, avaliou-se o número de lesões foliares.

## **Delineamento experimental e análises estatísticas**

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e repetidos por duas vezes ao longo do tempo. Utilizou-se esquema fatorial para: os testes *in vitro* 10x7 (Fungicida x Concentração), efeito protetor 6x5 (Fungicida x Concentração), atividade translaminar 5x6 (Fungicida x Tempo) e persistência 5x6 (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  $CE_{50}$  (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:  $CE_{50} < 1 \mu\text{g i.a./ml}$ : alta sensibilidade (AS);  $CE_{50} 1 - 10 \mu\text{g i.a./ml}$ : moderada sensibilidade (MS);  $CE_{50} 10 - 50 \mu\text{g i.a./ml}$ : baixa sensibilidade (BS) e  $CE_{50} > 50 \mu\text{g i.a./ml}$ : insensibilidade (IS).

As análises foram processadas com auxílio do programa SAEG. 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. 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***

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, epoxiconazole+pyraclostrobin, pyraclostrobin e tebuconazole reduziram a severidade, independentemente da concentração utilizada (Figura 1B).

### **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 (Figura 2A).

### **Efeito curativo**

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

### **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 (Figura 3).

### **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. Epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e tebuconazole foram eficientes após 24 h, pois não houve infecção a partir desse período (Figura 4A).

### **Persistência**

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 4B).

## **DISCUSSÃO**

A germinação dos conídios de *C. candelabrum* foi influenciada, significativamente, pelos diferentes princípios ativos testados. Esse processo envolve grande gasto 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 & Sheglov, 2002; Buck & Williams-Woodward, 2003; 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*, para a qual a germinação de conídios

foi pouco sensível a azoxystrobin, mas altamente sensível a trifloxystrobin (Reuveni & Sheglov, 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 & Sheglov, 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 de *C. candelabrum*. Para outros patógenos como *Colletotrichum lindemuthianum* (Marangoni & Barros, 2002) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (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 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* quanto ao crescimento micelial (Matheron & Porchas, 2004).

Todos os fungicidas triazóis 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 triazóis (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 14α-demetilase do citocromo P450, responsável pela demetilação do carbono 14α e impede que a enzima continue o processo de demetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol (Ghini & Kimati, 2000). Triazóis também 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* 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 foram reduzidos 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 também 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 triazóis foram altamente efetivos, independente 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. 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 erradicá-lo (Wong & Wilcox, 2001).

Atividade translaminar de estrobilurinas 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* 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 indicando 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 sob condições favoráveis ao patógeno.

Dentre os fungicidas testados quanto à persistência, azoxystrobin não conferiu proteção a *C. candelabrum* na concentração testada. Contudo, em estudos 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, que são fundamentais para o manejo de doenças, pois muitos fungicidas podem ter efeitos fitotóxicos, 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. 4<sup>th</sup> ed. Academic. San Diego. 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 eradicant 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.
- BUCK, J.W. & WILLIAMS-WOODWARD, J.L. The effect of fungicides on urediniospore germination and disease development of daylily rust. Crop Protection 22:135-140. 2003.

- 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.
- 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.
- MARANGONI, 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.

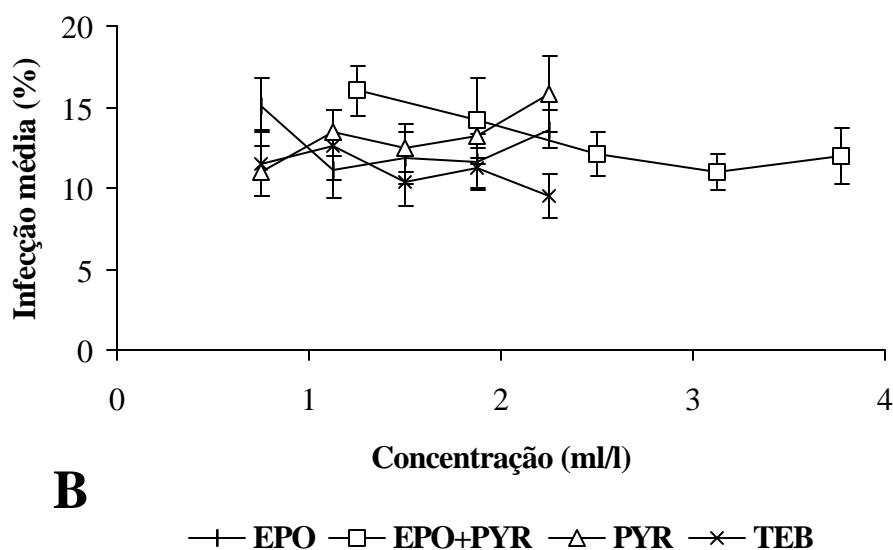
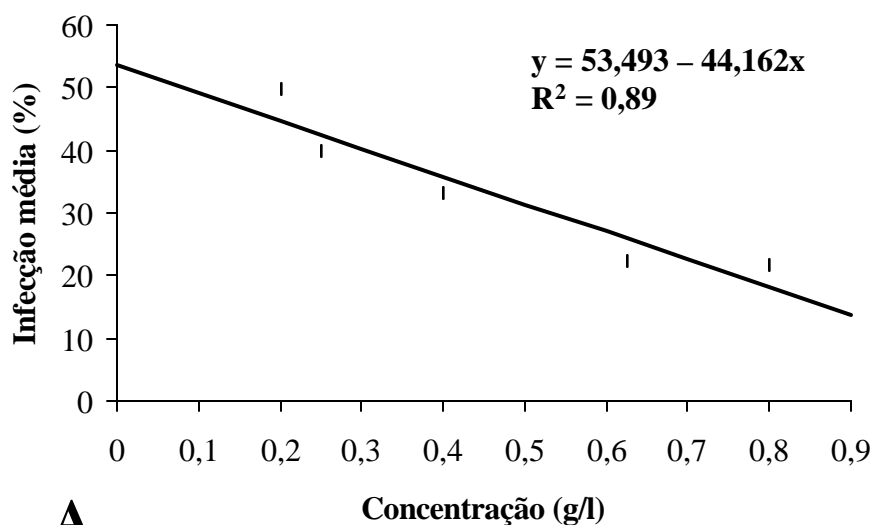
- OLAYA, G. & KÖLLER, W. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Disease* 83:274-278. 1999.
- PAREDES, B.S.G. & MUNOZ, F.R. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose 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. Universidade Federal de Viçosa. 1988.
- VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I., & LIBERATO, J.R. QUANT. A software plant disease severity assessment. Abstract, 8<sup>th</sup> 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.

**TABELA 1** – Concentração efetiva inibitória de 50% do crescimento micelial e da germinação de conídios (CE<sub>50</sub>), Concentração mínima inibitória (CMI) e sensibilidade de *Cylindrocladium candelabrum* a fungicidas

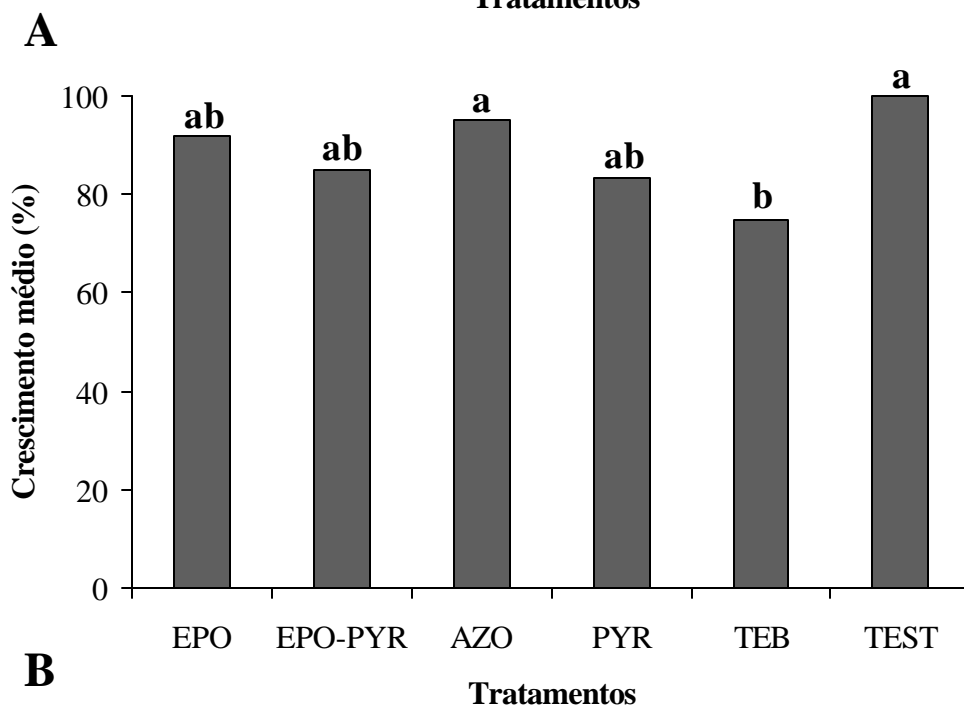
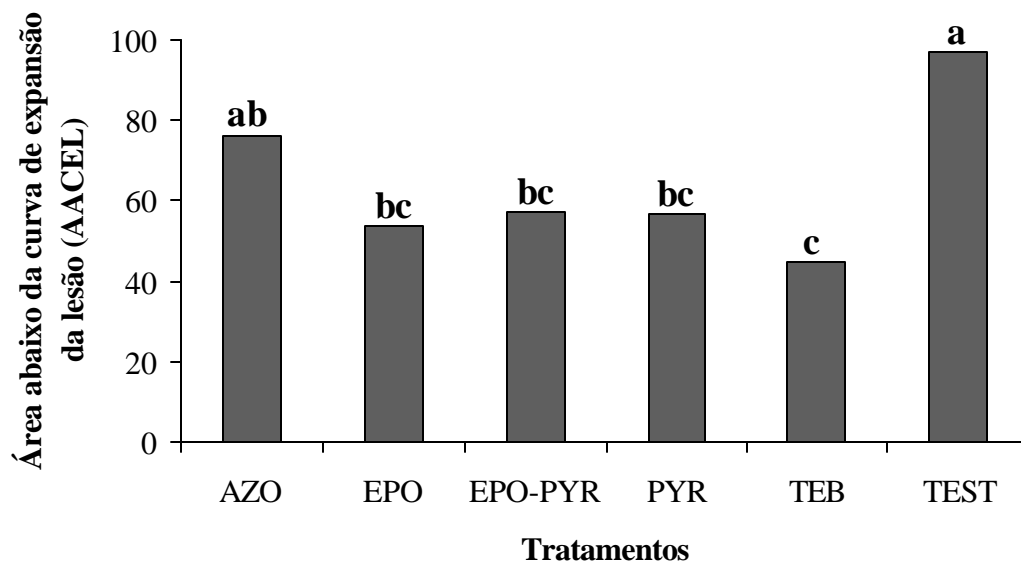
Fungicida	Germinação de conídios (mg i.a./ml)			Crescimento micelial (mg i.a./ml)		
	CE <sub>50</sub>	Sensibilidade*	CMI	CE <sub>50</sub>	Sensibilidade*	CMI
	Azoxystrobin	5,40	MS	>1000	437,55	IS
Boscalid	42,22	IS	>1000	7,44	MS	>1000
Carbendazim	**	**	**	54,38	IS	>1000
Epoxiconazole	<0,1	AS	12,04	0,13	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.

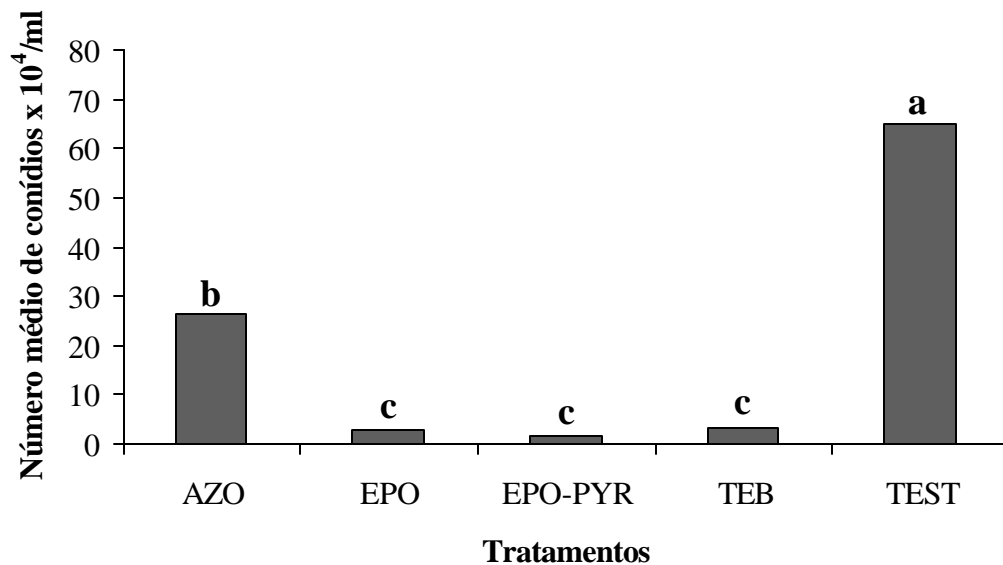
\*\*valores não calculados devido à semelhança da porcentagem de inibição para as diferentes concentrações.



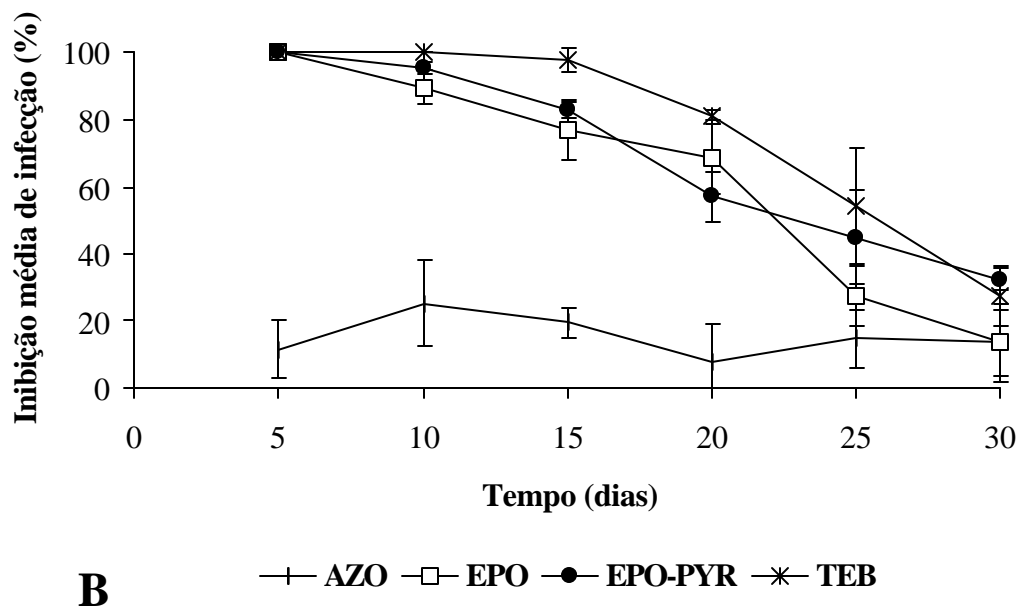
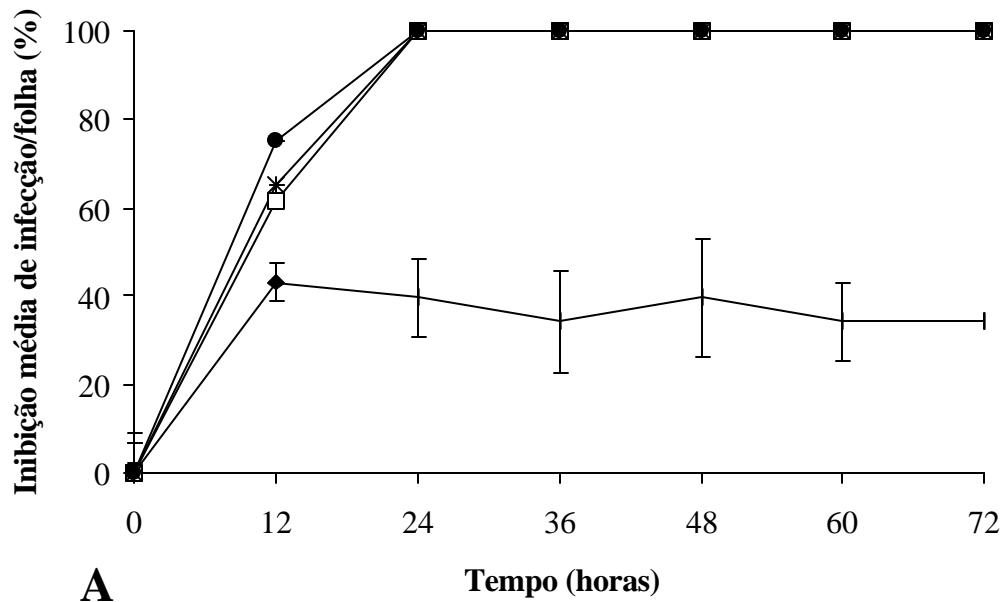
**FIG. 1** – Porcentagem de infecção média causada por *Cylindrocladium candelabrum*, após pulverização com diferentes fungicidas em folhas de eucalipto. A) Infecção média após pulverização com azoxystrobin. A regressão foi significativa ( $p = 0,0085$ ). B) Infecção média após pulverização de AZO – Azoxystrobin, EPO – Epoxiconazole, EPO-PYR – Epoxiconazole+pyraclostrobin, PYR – Pyraclostrobin e TEB – Tebuconazole. As regressões não foram significativas.



**FIG. 2** – A) Área abaixo da curva de expansão da lesão causada por *Cylindrocladium candelabrum*, CV: 25,10%. B) Crescimento médio de *C. candelabrum* em meio de cultura após isolamento indireto, CV: 18,32%. AZO – Azoxystrobin, EPO – Epoxiconazole, EPO-PYR – Epoxiconazole+pyraclostrobin, PYR – Pyraclostrobin, TEB – Tebuconazole e TEST – Testemunha. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



**FIG. 3** – Número médio de conídios (n) produzidos em lesões causadas por *C. candelabrum*, CV: 28,08%. AZO – Azoxystrobin, EPO – Epoxiconazole, EPO-PYR – Epoxiconazole+pyraclostrobin, PYR – Pyraclostrobin, TEB – Tebuconazole e TEST – Testemunha. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



**FIG. 4** – A) Inibição média de infecção causada por *Cylindrocladium candelabrum* na superfície abaxial de folhas de eucalipto após aplicação na superfície adaxial dos diferentes fungicidas: B) Inibição média de infecção causada por *Cylindrocladium candelabrum* em diferentes períodos, sendo AZO – Azoxystrobin, EPO – Epoxiconazole, EPO-PYR – Epoxiconazole+pyraclostrobin e TEB – Tebuconazole calculados em relação à testemunha.

## ARTIGO 2

### Fungicidas sistêmicos para o controle de *Quambalaria eucalypti* e seus efeitos na produção de miniestacas de eucalipto para enraizamento

#### RESUMO

A mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*, constitui atualmente, uma das principais doenças em minijardins clonais com fertirrigação por gotejamento em leito de areia ou inundação temporária em tanques hidropônicos. Tendo em vista a inexistência de estudos sobre a efetividade de fungicidas para o controle do patógeno, avaliou-se o efeito protetor, curativo e anti-esporulante de fungicidas sistêmicos e sua influência na produção de miniestacas para enraizamento. Dentre os nove princípios ativos testados, azoxystrobin, epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin, pyraclostrobin e tebuconazole destacaram-se como os mais efetivos. Além disso, epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e tebuconazole apresentaram efeito protetor, curativo e anti-esporulante para *Q. eucalypti*. Em minijardim, à exceção de epoxiconazole+pyraclostrobin, nenhum dos fungicidas testados influenciou a produção de miniestacas para enraizamento.

## 1. Introdução

*Quambalaria eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart) foi descrito inicialmente na África do Sul, em 1993 (Wingfield et al., 1993). No Brasil, o patógeno foi relatado pela primeira vez em 2003, na região de Guaíba, RS. Atualmente encontra-se distribuído nas principais regiões eucaliptocultoras causando manchas foliares e anelamento de hastes em minicepas e mudas clonais de eucalipto (Alfenas et al., 2004).

*Quambalaria eucalypti* caracteriza-se pela esporulação branca pulverulenta sobre as lesões, o que facilita a dispersão do patógeno pelo vento e pelas ferramentas de poda que são utilizadas nas coletas das brotações em minicepas. A infecção se dá na haste principal de mudas e de porções apicais de brotações de minicepas e folhas (Alfenas et al., 2004). No minijardim, em geral, há condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, como altas temperaturas, além dos ferimentos que ocorrem durante as podas e/ou retirada freqüente de brotações para enraizamento. Pouco se conhece sobre a epidemiologia da doença (Andrade, 2004). Além disso, inexistem estudos envolvendo fungicidas para o controle da doença.

O controle químico é utilizado nas fases da propagação clonal do eucalipto somente em caráter emergencial (Ruiz, 1988; Alfenas et al., 2004). Todavia, sabe-se que determinadas moléculas possuem propriedades que interferem no crescimento da planta (Gao et al., 1988). Sendo assim, o conhecimento sobre a atividade fungicida e propriedade reguladora de crescimento é de interesse para produção de mudas de eucalipto, pois o controle de doenças não deve interferir de forma negativa na capacidade produtiva dos minijardins e sobre o crescimento das mudas.

Diante dessas considerações, o presente trabalho objetivou avaliar a efetividade protetora, curativa e anti-esporulante de fungicidas para *Q. eucalypti* em plantas de eucalipto, bem como, estudar o efeito dessas moléculas sobre a capacidade produtiva de minicepas e sobre o crescimento de mudas de eucalipto.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Efetividade in vitro dos fungicidas

Utilizaram-se os princípios ativos azoxystrobin (Amistar 500 WG), triadimenol (Bayfidan CE), boscalid (Cantus WG), pyraclostrobin (Comet CE), carbendazim (Derosal 500 SC), tetraconazole (Domark 100 CE), tebuconazole (Folicur 200 CE), epoxiconazole +pyraclostrobin (Opera CE) e epoxiconazole (Opus CE). De cada produto, as concentrações testadas foram 0,1, 1, 5, 10, 50, 100 e 1000 µg de i.a./ml.

#### 2.1.1. Inibição da germinação de conídios

Suspensões de conídios foram obtidas a partir de colônias em crescimento com esporulação em meio BDA (Batata, dextrose e ágar), 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  $2 \times 10^4$  conídios/ml. Após homogeneização, 50 µL da suspensão foram pipetados para lâmina 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.

#### 2.1.2. Inibição do crescimento micelial

Avaliou-se a eficiência de fungicidas em inibir o crescimento micelial de *Q. eucalypti*. 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 suspensão 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 10 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  $\mu\text{M}$  de fótons/m<sup>2</sup>/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 à testemunha.

## 2.2. 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 1g de superfosfato simples por litro da mistura. As mudas foram mantidas em casa-de-vegetação por 20-30 dias e, semanalmente, foram adubadas com nutriente tipo Ouro verde<sup>®</sup>. As plantas foram inoculadas com suspensão de 10<sup>5</sup> conídios/ml.

Suspensões de conídios foram obtidas a partir de colônias em crescimento com esporulação *Q. eucalypti* em meio BDA (Batata, dextrose e ágar) após cinco dias de incubação a 27°C e fotoperíodo de 12 h.

Os fungicidas sistêmicos com as respectivas concentrações, selecionados com base nos testes *in vitro* foram: azoxystrobin (0,4 g/l), pyraclostrobin (1,5 ml/l), tebuconazole (1,5 ml/l), epoxiconazole+pyraclostrobin (2,5 ml/l) e epoxiconazole (1,5 ml/l). Os fungicidas foram veiculados em água e aplicados por meio de atomizador manual, em ambas as faces do limbo foliar de plantas de eucalipto as quais foram deixadas por 24 h. As avaliações foram realizadas pela quantificação do número de lesões por folha.

### 2.2.1. 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. Para isso, pulverizaram-se os fungicidas nas plantas, as quais, após 24 h, foram inoculadas com *Q. eucalypti* e colocadas em câmara de crescimento a 28 °C e fotoperíodo de 12 h. após 10 dias avaliou-se o número de lesões por folha.

### 2.2.2. 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) e tebuconazole (1,5 ml/l). Após 10 dias da inoculação do patógeno e cinco da aplicação dos fungicidas, a partir de quatro folhas totalmente expandidas, previamente marcadas, foram retirados cinco fragmentos/folha das bordas das lesões a fim de avaliar a sobrevivência do patógeno. Para isso, os fragmentos foram colocados 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. Após 5 dias, foi feita a avaliação baseada no crescimento de *Q. eucalypti* a partir das lesões em cada placa de Petri e calculou-se a porcentagem de crescimento médio a partir das lesões.

### 2.2.3. Efeito anti-esporulante

Para avaliar o efeito anti-esporulante dos fungicidas, as mudas foram inoculadas com o patógeno e após 10 dias em câmara de crescimento a 28 °C. As

plantas foram transferidas para casa-de-vegetação. Após cinco dias, plantas contendo lesões sem esporulação foram pulverizadas com os diferentes fungicidas e transferidas para câmara de crescimento a 28 °C. Após seis dias, retiraram-se discos de 3 mm de diâmetro das folhas lesionadas com auxílio de um perfurador. Os discos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 ml de água destilada esterilizada. Após agitação para a liberação dos esporos das lesões, determinou-se o número de esporos/ml com auxílio de hemacitômetro.

#### *2.2.4. Efeito sobre a produção de esporos*

Avaliou-se o efeito dos fungicidas sobre a produção de esporos ao longo do tempo. Para isso, as mudas foram inoculadas conforme descrito anteriormente e após 10 dias em câmara de crescimento, realizou-se a pulverização dos fungicidas. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h da pulverização, foram retirados discos de 3mm de diâmetro das folhas lesionadas com auxílio de um perfurador. Os discos foram colocados em tubos de ensaio contendo 5ml de água destilada esterilizada e agitados para a liberação dos esporos das lesões. A quantificação do número de esporos/ml foi realizada com auxílio de hemacitômetro.

#### *2.3. Efeito de fungicidas sobre a capacidade produtiva de minicepas e sobre o crescimento de mudas de eucalipto*

Os experimentos foram realizados em minijardim clonal em leito de areia, empregando-se três clones híbridos de eucalipto (*E. grandis* x *E. urophylla*). Utilizaram-se os seguintes fungicidas e concentrações: pyraclostrobin – 1,5 e 3,0 ml/l, azoxystrobin – 0,2 e 0,4 ml/l, epoxiconazole+pyraclostrobin – 2,5 e 5,0 ml/l, epoxiconazole – 1,5 e 3,0 ml/l, tebuconazole – 2,0 e 4,0 ml/l, triadimenol – 2,0 e 4,0 ml/l e tetraconazole – 1,0 e 2,0 ml/l. Os fungicidas foram aplicados com pulverizador manual com bico ejetor tipo cone. A solução de fungicidas foi preparada e aplicada duas vezes num intervalo de sete dias. Após sete dias da última aplicação, as miniestacas foram coletadas, quantificadas por tratamento.

Das miniestacas coletadas, 25% foram estaqueadas em substrato de enraizamento constituído de mistura de composto de casca de eucalipto, casca de arroz carbonizada, vermiculita (50:25:25), enriquecida com 3 Kg de Osmocote (19:06:10)/m<sup>3</sup> e 3 Kg de Super Fostato Simples/m<sup>3</sup> e colocadas em casa-de-enraizamento. Após 25 dias, quantificou-se o número de miniestacas enraizadas e, posteriormente calculou-se o enraizamento médio.

Para avaliar a produção de biomassa do sistema radicular, as raízes foram lavadas em água de torneira até que todo o substrato fosse inteiramente removido. As raízes foram acondicionadas em saco de papel e levadas à estufa para secagem (70°C/48h). Após a secagem, determinou-se a biomassa radicular seca (mg) em balança de precisão.

#### *2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas*

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e repetidos por duas vezes ao longo do tempo. Utilizou-se esquema fatorial para: os testes *in vitro* 10x7 (Fungicida x Concentração), efeito protetor 5x5 (Fungicida x Concentração), efeito sobre a produção de esporos 4x7 (Fungicida x Tempo). Nos experimentos de atividade anti-esporulante utilizaram-se 5 tratamentos e para verificar o efeito de fungicidas sobre a capacidade produtiva de minicepas e sobre o crescimento de mudas de eucalipto utilizou-se esquema fatorial 9x2 (Fungicida x Concentração). Em todos os experimentos utilizaram-se quatro repetições por tratamento e uma testemunha pulverizada com água.

Para análise dos testes *in vitro*, calcularam-se os valores de EC<sub>50</sub> (Concentração efetiva inibitória de 50% do crescimento micelial e da germinação de conídios), por meio da transformação log-probit (Finney, 1971), 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: EC<sub>50</sub> < 1 µg i.a./ml: alta

sensibilidade (AS);  $EC_{50}$  1 – 10  $\mu\text{g i.a./ml}$ : moderada sensibilidade (MS);  $EC_{50}$  10 – 50  $\mu\text{g i.a./ml}$ : baixa sensibilidade (BS) e  $EC_{50} > 50 \mu\text{g i.a./ml}$ : insensibilidade (IS).

As análises foram processadas com auxílio do programa SAEG. 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, utilizou-se o teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### **3. Resultados**

#### *3.1. Efetividade in vitro de fungicidas*

A efetividade dos fungicidas variou com o patógeno e o princípio ativo utilizado. Quanto ao crescimento micelial *Q. eucalypti* foi altamente sensível a epoxiconazole, pyraclostrobin, epoxiconazole+pyraclostrobin, tetraconazole e triadimenol. Quanto à germinação de conídios, os mais efetivos foram azoxystrobin, pyraclostrobin, epoxiconazole+pyraclostrobin, epoxiconazole. Para tebuconazole não foi possível calcular a  $EC_{50}$ , pois o crescimento micelial do fungo foi inibido em 100% em todas as concentrações testadas. Entretanto, quanto à germinação de conídios *Q. eucalypti* teve moderada sensibilidade. Triadimenol também foi pouco efetivo quanto à germinação de conídios. Boscalid foi pouco efetivo, tanto para o crescimento micelial quanto para a germinação de conídios (Tabela 1). Para carbendazim, não foi observada inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios nas concentrações testadas.

### 3.2. Eficiência dos fungicidas em plantas de eucalipto

#### 3.2.1. Efeito protetor

O efeito protetor variou com o princípio ativo utilizado. Contudo, não houve interação de concentração, fungicida e época. Todos os fungicidas inibiram a infecção de *Q. eucalypti*. Epoxiconazole+pyraclostrobin, epoxiconazole, pyraclostrobin e tebuconazole protegeram eficientemente as mudas de eucalipto nas concentrações utilizadas e reduziram a infecção em aproximadamente 85%, independente da concentração testada. Azoxystrobin inibiu a infecção em aproximadamente 40% (Fig. 1). Pyraclostrobin, apesar de inibir a infecção, provocou queima nas bordas das folhas pulverizadas não foi testado quanto aos efeitos curativo e anti-esporulante.

#### 3.2.2. Efeito curativo

O efeito curativo variou de acordo com o princípio ativo empregado. O fungicida mais efetivo foi epoxiconazole+pyraclostrobin, o que resultou em 90% de erradicação. Os fungicidas epoxiconazole e tebuconazole erradicaram o patógeno em 30 e 20% das lesões, respectivamente. Azoxystrobin não diferiu da testemunha (Fig. 2). Para epoxiconazole e tebuconazole, observou-se esporulação no centro das lesões após 96 h da aplicação dos fungicidas. Para epoxiconazole+pyraclostrobin, não houve crescimento do fungo após realizado o isolamento indireto.

#### 3.2.3. Efeito anti-esporulante

A aplicação dos fungicidas sobre as lesões sem esporos evidenciou que epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e tebuconazole foram os mais efetivos, quanto ao efeito anti-esporulante de *Q. eucalypti*. Azoxystrobin apresentou efeito intermediário em relação aos demais fungicidas testados (Fig. 3).

### 3.2.4. Efeito sobre a produção de esporos

A produção de esporos foi afetada por todos os fungicidas testados. Epoxiconazole+pyraclostrobin resultou em 100% de redução a partir de 72h da aplicação. Em contrapartida, a maior inibição da produção de esporos para azoxystrobin ocorreu somente a partir de 120 h, e posteriormente houve um incremento no número de esporos. Os fungicidas epoxiconazole e tebuconazole apresentaram 100% de eficiência a partir de 96 e 144 h, respectivamente (Fig. 4).

### 3.3. Efeito de fungicidas sobre a capacidade produtiva de minicepas e sobre o crescimento de mudas de eucalipto

O efeito dos fungicidas variou de acordo com o clone e variável analisada. Não houve interação significativa fungicida x dose para nenhum dos clones testados. À exceção de epoxiconazole+pyraclostrobin, nenhum dos fungicidas afetou a produção de miniestacas, o enraizamento médio e a produção de biomassa radicular (Figs. 5, 6 e 7). Dois dos clones testados não diferiram estatisticamente da testemunha para as três variáveis analisadas. O número médio de miniestacas produzidas foi reduzido após a aplicação de epoxiconazole+pyraclostrobin. Os demais fungicidas não diferiram estatisticamente da testemunha (Fig. 5A-5C). Epoxiconazole+pyraclostrobin também influenciou, significativamente, o enraizamento de miniestacas de eucalipto do clone 1. Os demais fungicidas não diferiram da testemunha para essa variável (Fig. 6A-6C). O clone 1 também foi influenciado negativamente quanto à produção de biomassa radicular. Os demais fungicidas não influenciaram nessa variável (Fig. 7A-7C).

## 4. Discussão

Nesse estudo, *Q. eucalypti* teve baixa sensibilidade a azoxystrobin, como também observado em outros estudos. Essa baixa sensibilidade micelial foi atribuída

à ativação da respiração alternativa (Olaya et al., 1998; Ypema e Gold, 1999). O modo de ação de estrobilurinas é bastante conhecido, na qual bloqueiam o transporte de elétrons do citocromo b para o c1, sendo inibidores específicos do complexo III da cadeia de respiração mitocondrial (Ypema e Gold, 1999).

A atividade protetora varou com o fungicida testado e isso pode estar relacionado com a persistência do princípio ativo nos tecidos da planta, uma vez que, *Q. eucalypti*, antes de infectar, coloniza amplamente a superfície foliar por um período mínimo de 10 dias (Andrade, 2004). Sendo assim, acredita-se que epoxiconazole+pyraclostrobin, epoxiconazole, pyraclostrobin e tebuconazole persistem no interior dos tecidos por pelo menos 10 dias. Também foi observada atividade protetora de triazóis para *Puccinia psidii*, outro importante patógeno de eucalipto (Ruiz, 1988).

Epoxiconazole+pyraclostrobin apresentou alta atividade curativa e impediu o crescimento do fungo a partir dos tecidos lesionados. Embora, a ação fosse mais eficaz nos tratamentos protetores que nos curativos, como visto também por Karadimos et al. (2005), epoxiconazole e tebuconazole também inibiram o crescimento do fungo em parte das lesões. Triazóis também foram eficientes no controle de *Cercospora beticola* em beterraba açucareira em condições de campo (Khan e Smith, 2005). Azoxystrobin teve eficiência moderada no controle de *C. beticola* e *Erysiphe betae* (Anesiadis et al., 2003) e *Plasmopara viticola* (Wong e Wilcox, 2001). Nesse estudo, somente com o fungicida epoxiconazole+pyraclostrobin ocorreu inibição do crescimento em 90% das lesões. Esse resultado está relacionado ao alto potencial curativo desse princípio ativo. Em outros trabalhos, vários princípios ativos não mataram o fungo já estabelecido no interior dos tecidos do hospedeiro (Wong e Wilcox, 2001; Anesiadis et al., 2003; Karadimos et al., 2005), o que pode estar relacionado à concentração que atinge, efetivamente, o interior do tecido. A baixa concentração impede a expansão da lesão, sem contudo, erradicar o fungo estabelecido.

Na avaliação do efeito anti-esporulante, à exceção de epoxiconazole+pyraclostrobin, todos os demais fungicidas não impediram que *Q. eucalypti* tornasse a esporular. Azoxystrobin foi o menos efetivo, embora tenha

ocorrido decréscimo significativo na produção de esporos em relação à testemunha. Em outros trabalhos, azoxystrobin também foi eficiente em reduzir a produção de esporos de diferentes patógenos (Leinhos et al., 1997; Anesiadis et al., 2003). O efeito anti-esporulante é extremamente importante para o controle de doenças em minijardim de eucalipto, sobretudo porque, nesse local, as minicepas são constantemente manejadas, o que favorece a disseminação por ferramentas de podas e pelos operários.

A eficácia de azoxystrobin na redução da esporulação manteve-se ao longo do tempo até 144 h. O que sugere um intervalo de aplicação de seis dias (Fig. 4). Adicionalmente, epoxiconazole+pyraclostrobin reduziu em 100% a esporulação a partir de 72 h, sem haver aumento posterior na produção de esporos. Em vista desse resultado, pode-se racionalizar as pulverizações dos princípios ativos em condições de viveiros, com o estabelecimento de um período de carência para a coleta de brotações de 72 h para este princípio ativo.

O efeito dos triazóis e estrobilurinas como reguladores do crescimento de plantas, além da atividade fungicida, foi estudado para várias culturas como trigo (Grossman e Retzlaff, 1997; Ypema e Gold, 1999), milho (Buchenauer e Rohner, 1985), fumo, gramíneas (Kane e Smiley, 1983), feijão (Davis et al., 1985) e macieira (Fletcher e Nath, 1984). Nesse estudo, epoxiconazole+pyraclostrobin reduziu o lançamento de (mini)estacas brotos de eucalipto. Triazóis também reduziram o lançamento de brotos e o crescimento de outras plantas (Kane e Smiley, 1983). Embora em outros estudos, com triazóis e estrobilurinas, tenham sido observados efeitos benéficos sobre a produção e crescimento de plantas (Ypema e Gold, 1999; Baby et al., 2004).

Epoxiconazole+pyraclostrobin reduziu o enraizamento de miniestacas para um dos clones testados. Triazóis usados como retardantes do crescimento de plantas, agem de forma antagônica a atividade ou biossíntese de giberelinas que normalmente inibem o enraizamento (Hartmann et al., 1997). Como verificado nesse estudo, epoxiconazole+pyraclostrobin influenciou negativamente o enraizamento e a produção de biomassa radicular para um dos clones testados. Segundo alguns estudos, os triazóis induzem amplas mudanças na morfologia e anatomia de plantas,

as quais estão relacionadas com o balanço hormonal (Gao et al., 1988; Baby et al., 2004). Dentre os efeitos dos triazóis e estrobilurinas descritos na literatura, já foram constatados: decréscimo de massa da parte aérea, tamanho da folha e tamanho da célula epidermal e incremento da espessura do mesófilo, cera epicuticular e tamanho de cloroplasto, bem como, o estreitamento de estômato, incremento ou redução de biomassa radicular ou da parte aérea, incremento na produção de grãos, dentre outros (Fletcher, 1986, Gao et al., 1988; Ypema e Gold, 1999; Baby et al., 2004).

Os fungicidas podem influenciar nas propriedades reguladoras de crescimento de plantas em diferentes graus, dependendo do genótipo da planta. Além disso, muitos reguladores de crescimento de plantas podem estar envolvidos nesse processo. Por isso, a aplicação de fungicidas, em viveiros, deve ser otimizada a fim de evitar fitotoxicidade e efeitos deletérios sobre a capacidade produtiva de minicepas e sobre o crescimento de mudas. Assim, conclui-se que, os produtos epoxiconazole e tebuconazole foram os mais efetivos, pois apresentaram atividade protetora, curativa e anti-esporulante e não foram fitotóxicos a minicepas e mudas de eucalipto.

## 5. Referências

- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Mafia, R.G., Assis, T.F., 2004. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa-UFV, Brasil.
- Andrade, G.C.G., 2004. *Quambalaria eucalypti*: características culturais, infectividade e quantificações da severidade da doença em eucalipto. (Tese de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. Brasil.
- Anesiadis, T., Karoaglanidis, G.S., Tzavella-Klonari, K., 2003. Protective, curative and eradicator activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. J. Phytopathol. 151,647-651.
- Baby, U.I., Balasubramanian, S., Ajay, D., Premkumar, R., 2004. Effect of ergosterol biosynthesis inhibitors on blister blight disease, the tea plant and quality of made tea. Crop Prot. 23,795-800.

- Buchenauer, H., Rohner, E., 1981. Effect of triadimefon and triadimenol on various plant species as well as on gibberellin content and sterol metabolism on shoots of barley seedlings. *Pest. Biochem. Physiol.* 15, 58-70.
- Davis, T.D., Sankhla, N., Walser, R.H., Upadhyaya, A., 1985. Promotion of adventitious root formation on cuttings by paclobutrazol. *HortScience.* 20, 883-884.
- Edgington, L.V., Khew, K.L., Barron, G.L., 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology.* 61, 42-44.
- Finney, D.J., 1971. Probit analysis. London: Cambridge University Press.
- Fletcher, R.A., Nath, V. 1984. Triadimefon reduces transpiration and increases yield in water stressed plants. *Plant Physiol.* 69, 422-426.
- Fletcher, R.A., Hofstra, G., Gao, J., 1986. Comparative fungitoxic and plant growth regulating properties of triazole derivatives. *Plant Cell Physiol.* 27, 367-371.
- Gao, J., Hofstra, G., Fletcher, R.A., 1988. Anatomical changes induced by triazoles in wheat seedlings. *Can. J. Bot.* 66, 1178-1185.
- Grossman, K., Retzlaff, G., 1997. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat. *Pestic. Sci.* 50,11-20.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Jr., F.T., Geneve, R.L., 1997. *Plant Propagation: principles and practices.* New Jersey: Prentice-Hall.
- Kane, R.T., Smiley, R.W., 1983. Plant growth-regulating effects of systemic fungicides applied to Kentucky Bluegrass. *Agron. J.* 75, 469-473.
- Karadimos, D.A., Karaoglanidis, G.S., Tzavella-Klonari, K., 2005. Biological activity and physical modes of action of the Qo inhibitor fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin against *Cercospora beticola*. *Crop Prot.* 24, 23-29.
- Khan, M.F.R., Smith, L.J., 2005. Evaluating fungicides for controlling *Cercospora* leaf spot on sugar beet. *Crop Prot.* 24, 79-86.
- Leinhos, G.M., Gold, R.E. Düggelein, M., Guggenheim, R., 1997. Development and morphology of *Uncinula necator* following treatment with the fungicides Kresoxim-methyl and penconazole. *Mycol. Res.* 101, 1033-1046.
- Olaya, G., Zheng, D., Köller, W., 1998. Differential response of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pestic. Sci.* 54, 230-236.

- Ruiz, R.A.R., 1988. Epidemiologia e controle químico da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto. (Tese de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa.
- Wingfield, M.J., Crous, P.W., Wijnand, J.S., 1993. *Sporothrix eucalypti* (sp. nov.), a shoot and leaf pathogen of eucalyptus in South Africa. Mycopathol. 123, 159-164.
- Wong, F.P., Wilcox, W.F., 2001. Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (Grapevine Downy Mildew). Plant Dis. 85, 649-656.
- Ypema, H.L., Gold, R.E., 1999. Kresoxim-methyl: modifications of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. Plant Dis. 83,4-19.

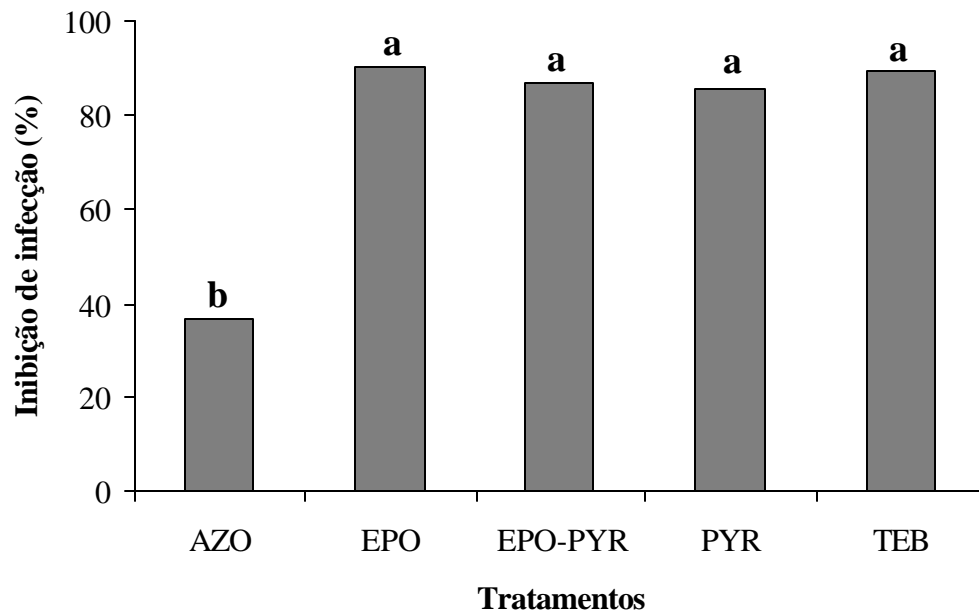
**Tabela 1**

Concentração inibitória de 50% do crescimento micelial e da germinação de conídios (EC<sub>50</sub>), Concentração mínima inibitória (CMI) e sensibilidade *in vitro* de *Quambalaria eucalypti* a fungicidas

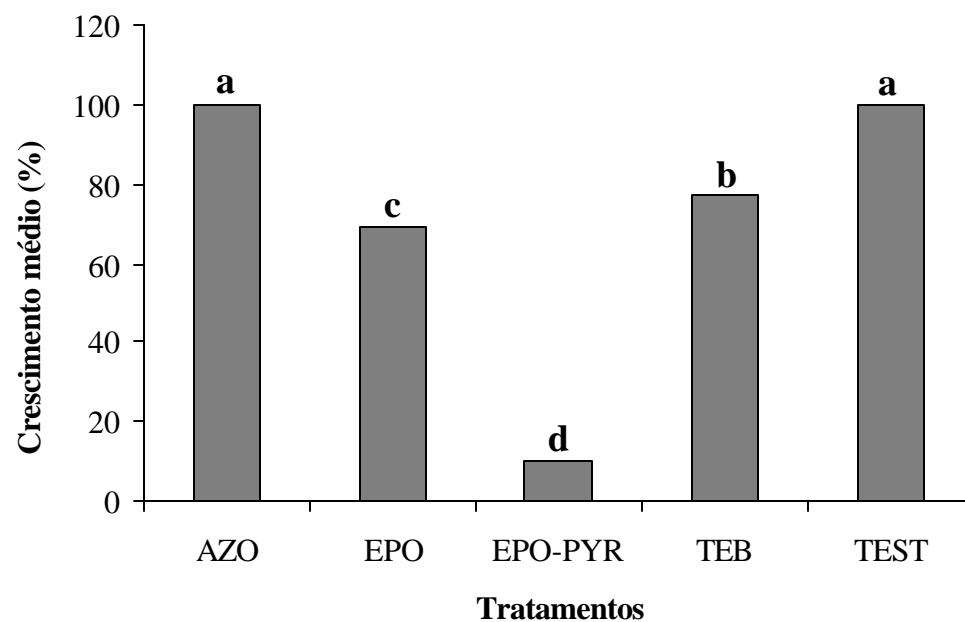
Fungicida	Germinação de conídios (mg i.a./ml)			Crescimento micelial (mg i.a./ml)		
	EC <sub>50</sub>	Sensibilidade*	CMI	EC <sub>50</sub>	Sensibilidade*	CMI
Azoxystrobin	0,12	AS	785,29	28,7	BS	>1000
Boscalid	574,83	IS	>1000	4,38	MS	>1000
Carbendazim	**	**	**	**	**	**
Epoxiconazole	0,23	AS	90,7	<0,1	AS	0,15
Epoxiconazole+pyraclostrobin-	<0,1	AS	9,51	<0,1	AS	0,13
Pyraclostrobin	0,32	AS	72,24	<0,1	AS	24,4
Tebuconazole	8,02	MS	>1000	**	**	**
Tetraconazole	13,45	BS	>1000	0,13	AS	1,77
Triadimenol	738,62	IS	>1000	<0,1	AS	2,05

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

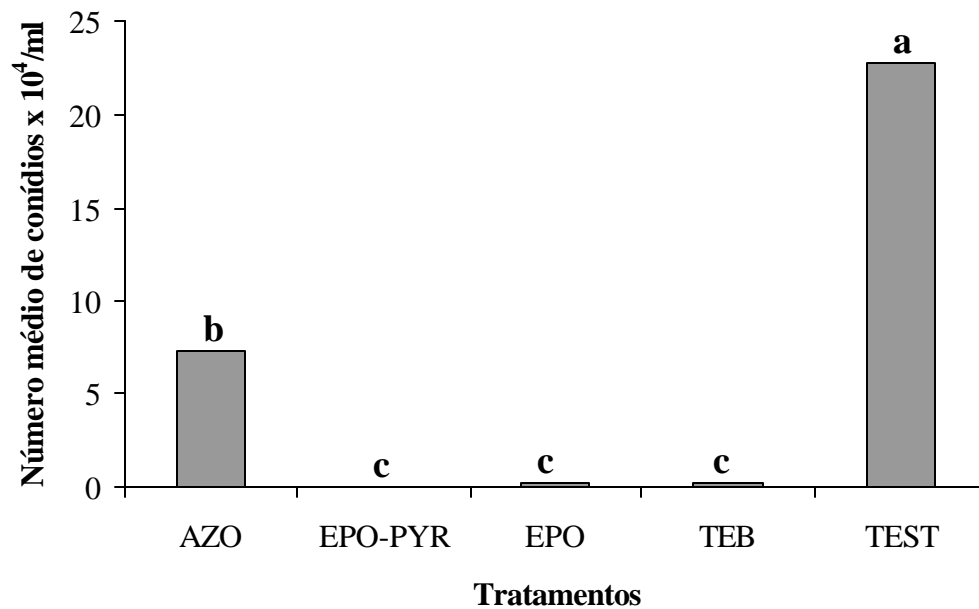
\*\*valores não calculados.



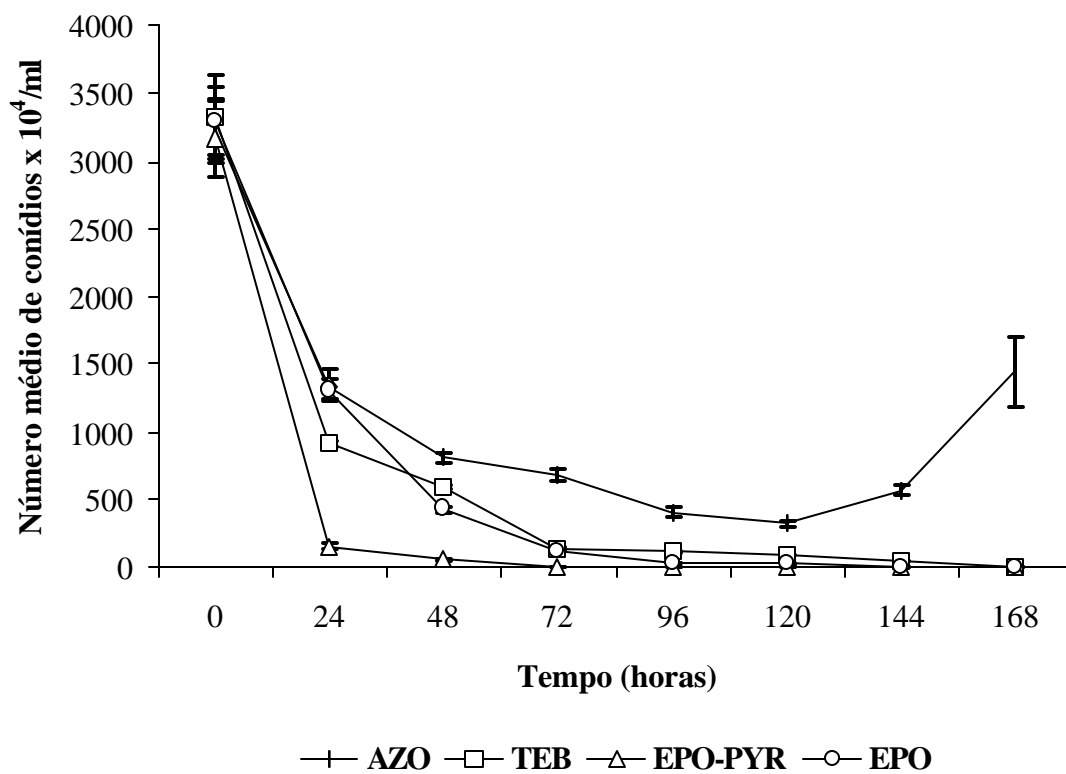
**Fig. 1.** Inibição média da infecção de *Quambalaria eucalypti* em folhas de eucalipto após pulverização com diferentes fungicidas. AZO – azoxystrobin, EPO – epoxiconazole, EPO-PYR – epoxiconazole+pyraclostrobin, PYR – pyraclostrobin e TEB – tebuconazole. CV: 17,02%. Colunas sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).



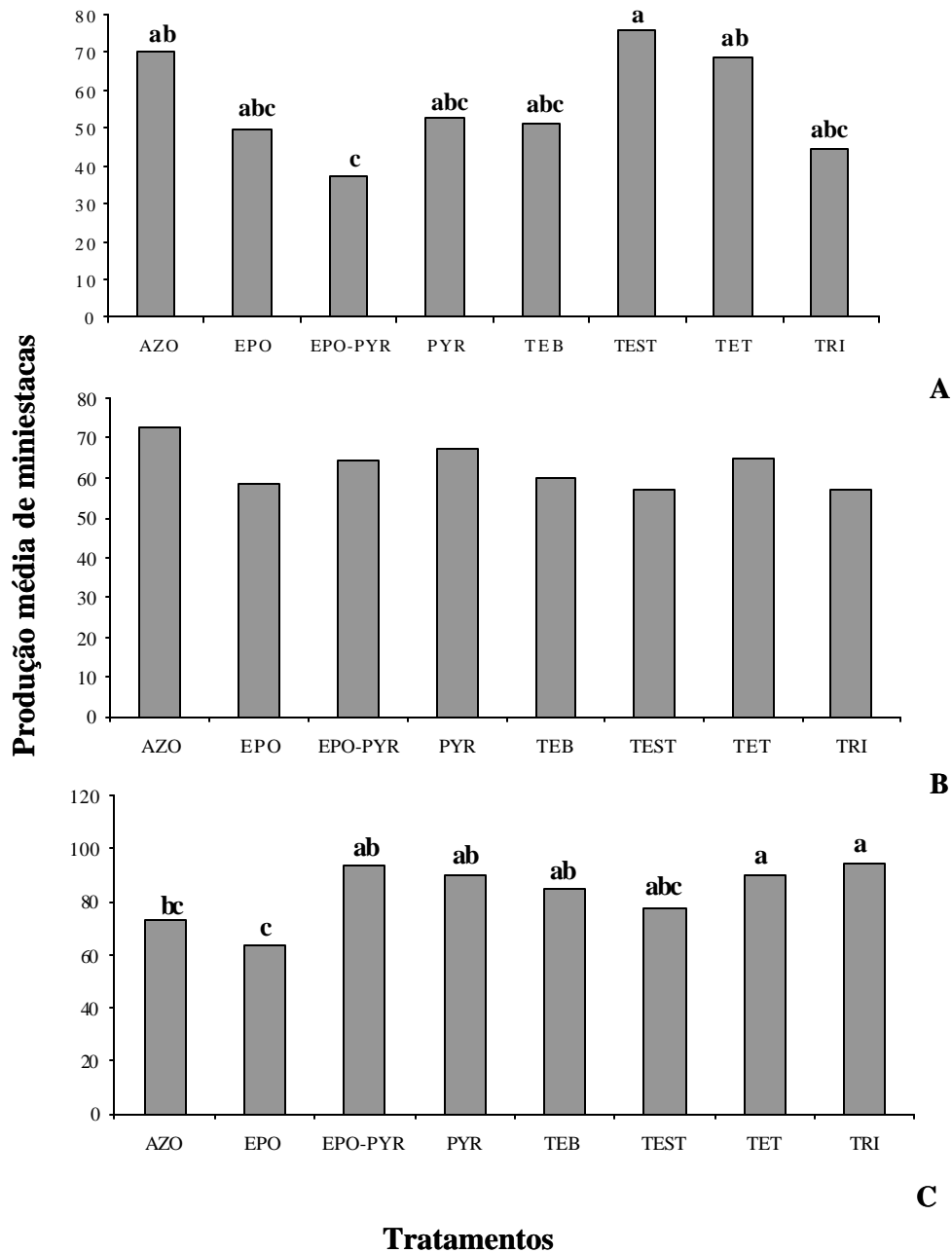
**Fig. 2.** Crescimento médio de *Quambalaria eucalypti* em meio de cultura após isolamento indireto. AZO – azoxystrobin, EPO – epoxiconazole, EPO-PYR – epoxiconazole+pyraclostrobin, PYR – pyraclostrobin, TEB – tebuconazole e TEST – testemunha. Colunas sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), CV: 3,90%.



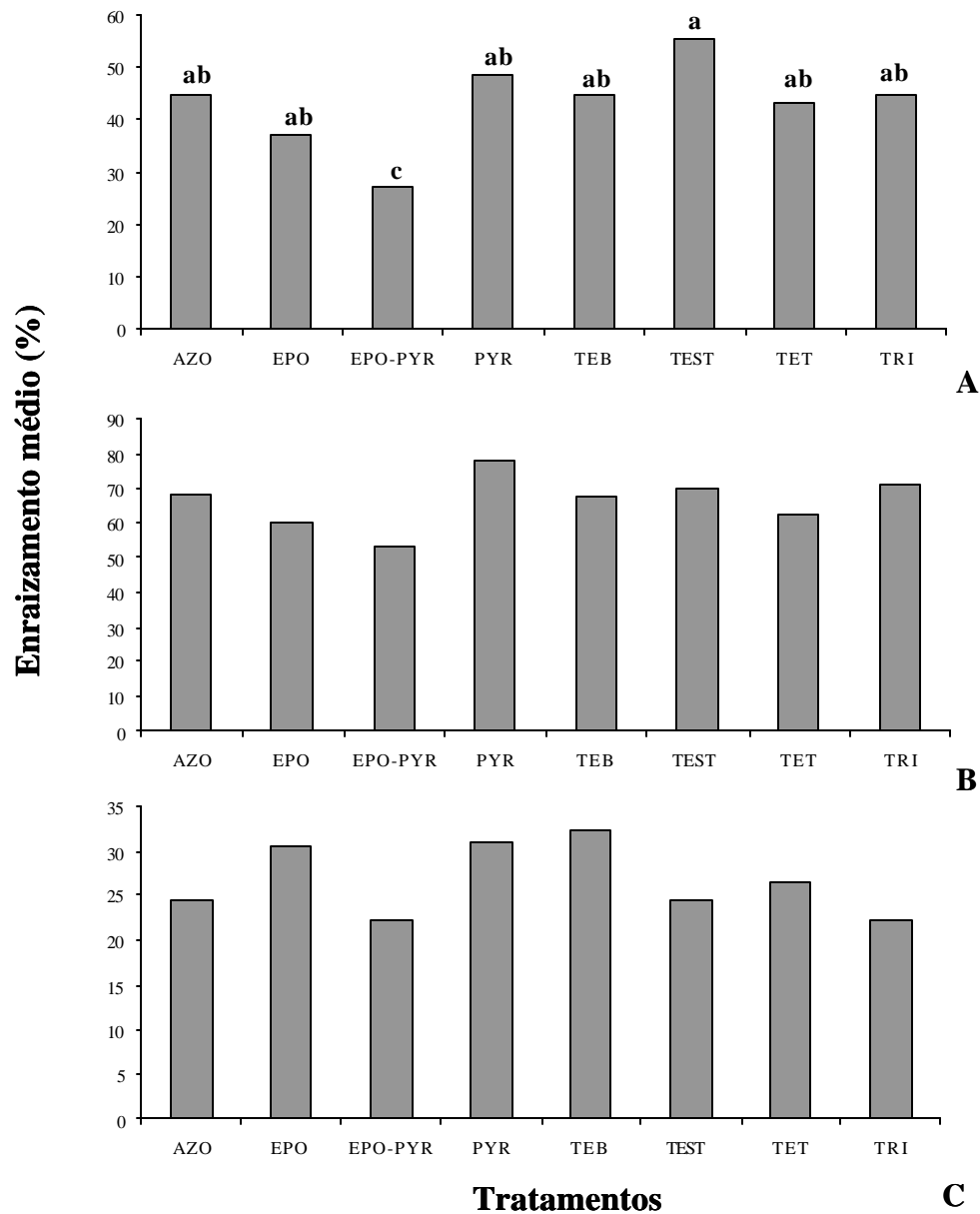
**Fig. 3.** Número médio de conídios de *Quambalaria eucalypti* após aplicação de fungicidas sobre lesões foliares. AZO – azoxystrobin, EPO – epoxiconazole, EPO-PYR – epoxiconazole+pyraclostrobin, PYR – pyraclostrobin, TEB – tebuconazole e TEST – testemunha. Colunas sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), CV: 18,50%.



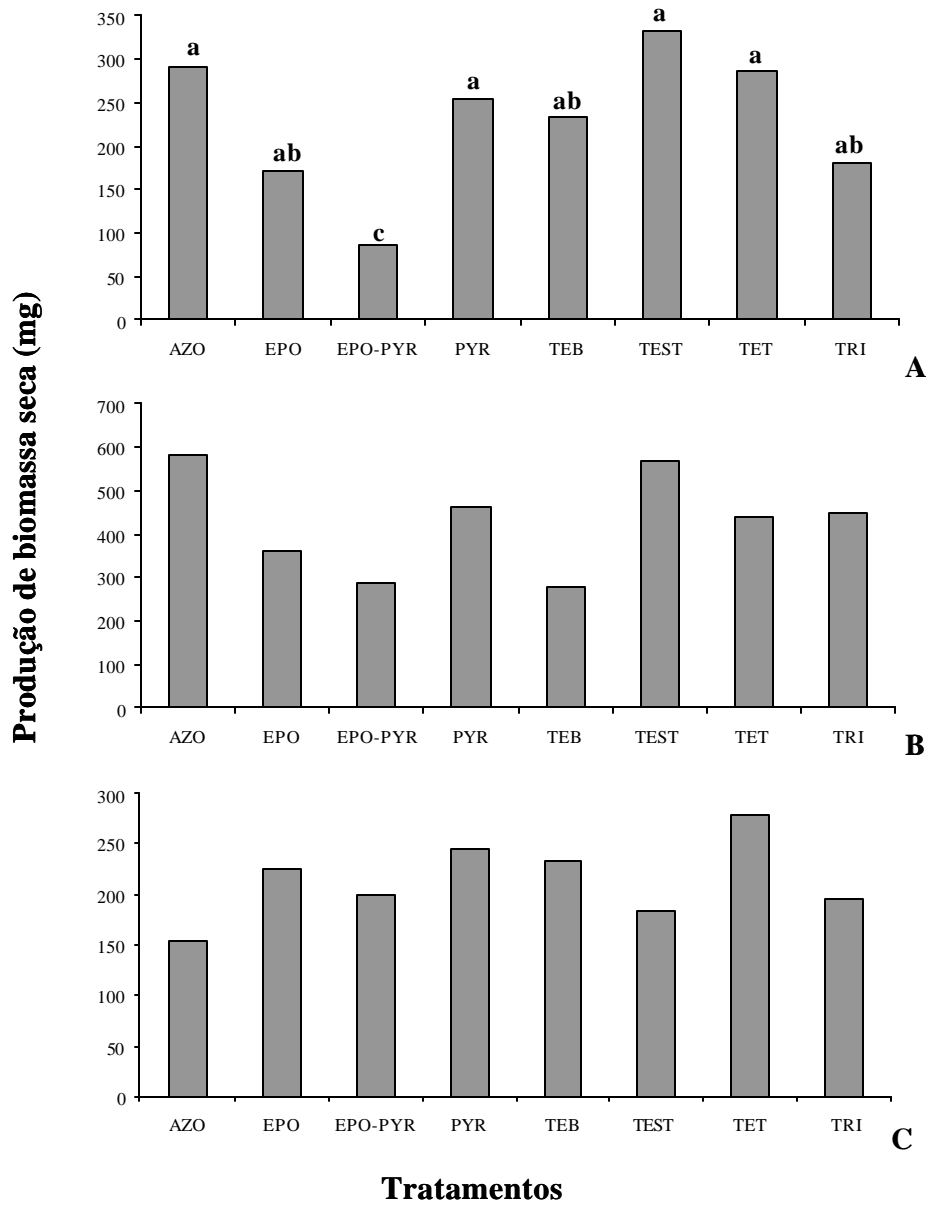
**Fig. 4.** Número médio de conídios (n) de *Quambalaria eucalypti* produzidos ao longo do tempo após aplicação dos fungicidas AZO – azoxystrobin, EPO – epoxiconazole, EPO-PYR – epoxiconazole+pyraclostrobin e TEB – tebuconazole.



**Fig. 5.** Efeito de fungicidas sobre a produção média de miniestacas de eucalipto. A) Clone 1. CV (%): 9,69, B) Clone 2. CV (%): 14,50 e C) Clone 3. CV (%): 4,58. AZO – Azoxystrobin, PYR – Pyraclostrobin, TET – Tetraconazole, TEB – Tebuconazole, TRI – Triadimenol, EPO-PYR – Epoxiconazole+pyraclostrobin, EPO – epoxiconazole e TEST – Testemunha. Os dados foram transformados em Log (x). Colunas sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



**Fig. 6.** Efeito de fungicidas sobre o enraizamento médio de miniestacas de eucalipto. A) Clone 1. CV (%): 10,01 B) Clone 2. CV (%): 17,99 e C) Clone 3. CV (%): 10,31. AZO – Azoxystrobin, PYR – Pyraclostrobin, TET – Tetraconazole, TEB – Tebuconazole, TRI – Triadimenol, EPO-PYR – Epoxiconazole+pyraclostrobin, EPO – epoxiconazole e TEST – Testemunha. Os dados foram transformados em raiz quadrada. Colunas sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



**Fig. 7.** Efeito de fungicidas sobre a produção de biomassa de mudas de eucalipto. A) Clone 1. CV (%): 27,40, B) Clone 2. CV (%): 31,76 e C) Clone 3. CV (%): 15,64. AZO – Azoxystrobin, PYR – Pyraclostrobin, TET – Tetraconazole, TEB – Tebuconazole, TRI – Triadimenol, EPO-PYR – Epoxiconazole+pyraclostrobin, EPO – Epoxiconazole e TEST – Testemunha. Os dados foram transformados em raiz quadrada. Colunas sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

## CONCLUSÕES GERAIS

Na primeira parte desse trabalho conclui-se que dentre os fungicidas testados, epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin e tebuconazole destacaram-se quanto ao efeito protetor, curativo e anti-esporulante para *Cylindrocladium candelabrum*. Além disso, tiveram atividade translaminar e persistência nos tecidos da planta. Tebuconazole protegeu plantas de eucalipto contra *C. candelabrum* em 100% em até 15 dias e epoxiconazole e epoxiconazole+pyraclostrobin em até 10 dias da aplicação dos produtos, o que indica maior intervalo de aplicação em condições de viveiro.

Na segunda parte, conclui-se que os produtos epoxiconazole e tebuconazole tiveram atividade protetora, curativa e anti-esporulante a *Q. eucalypti*, não influenciaram na capacidade produtiva de minicepas, no enraizamento e na produção de biomassa radicular.