

DETECÇÃO DOS FUNGICIDAS METIL-TIOFANATO, BENOMYL E TRIADIMEFON EM EXTRATOS DE FOLHAS DE SERINGUEIRA¹

LUIS PEDRO BARRUETO CID²

RESUMO - Em plantas de viveiro de *Hevea brasiliensis* com gema apical recém-entumescida, pesquisou-se, mediante cromatografia de camada fina e bioautografia, a persistência e a translocação dos fungicidas metil-tiofanato, triadimefon e benomyl. Em nenhum dos três foi detectada uma translocação na direção dos folíolos novos aos 7, 14 e 21 dias após pulverização das folhas do penúltimo lançamento. Nestas folhas, triadimefon não foi detectado a partir do sétimo dia, enquanto que se detectou metil-tiofanato até os quatorze dias e benomyl até os 21 dias. Sugere-se levar em consideração este efeito de persistência no controle do "mal-das-folhas".

Termos para indexação: translocação, mal-das-folhas, fungicida sistêmico.

DETECTION OF THE FUNGICIDES THIOPHANATE METHYL, BENOMYL AND TRIADIMEPHON IN EXTRACTS OF RUBBER TREE THROUGH THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND BIOAUTOGRAPHY

ABSTRACT - Translocation of the fungicides thiophanate methyl, benomyl and triadimephon was followed by thin layer chromatography and bioautography in nursery plants of *Hevea brasiliensis* in stage of apical budding burst. It was found out that any of the three fungicides may be detected in the new emerging leaves at 7, 14 and 21 days old after the spray application on the bottom flush leaves. Triadimephon was not detected on the seventh day after spray application; while thiophanate methyl was detected on the seventh and fourteenth days. Benomyl was detected on the seventh, fourteenth and twenty-first days after the spray application. Both, thiophanate methyl and benomyl were detected on the last bottom flush leaves but not on the young leaves, as was expected. It is suggested that this persistence effect may be important in controlling the South American leaf blight in the rubber tree.

Index terms: translocations, South American leaf blight, systemic fungicides.

INTRODUÇÃO

A doença conhecida pelo nome de "mal-das-folhas", provocada pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn) v. Arx, tem causado bastante prejuízo à heveicultura sul-americana.

Os esforços realizados para controlar este mal têm sido concentrados principalmente na obtenção de clones resistentes ao fungo e no controle químico da doença.

A resistência ao *M. ulei* está relacionada com o maior ou menor tempo de suscetibilidade dos folíolos jovens. No material mais suscetível, nos primeiros doze dias de idade das folhas, em cada lançamento, o desenvolvimento do fungo deve ser bloqueado pela ação de fungicidas (Manço 1967). Deste ponto de vista, o êxito no controle da relação *M. ulei* - seringueira, em favor desta última, vai depender tanto do tipo de tratamento (fungi-

cida, concentração e intervalos de aplicação Rocha et al. 1978), quanto dos períodos de ano de maior ocorrência de infestações (Medeiros 1976), coincidentes com os períodos de maior pluviosidade.

Em geral, nas plantas adultas, verifica-se a troca da folhagem anualmente. Exceto nos casos de lançamentos esporádicos, apenas nessa fase de reenfolhamento ocorre o estágio suscetível.

Em plantas juvenis, até o terceiro ano de idade, o crescimento é intermitente, com fluxos sucessivos, especialmente no período chuvoso. Assim, o conjunto das plantas de viveiro e jardim clonal estão constantemente apresentando folíolos suscetíveis, o que implica na necessidade de pulverizações semanais para a proteção dos novos fluxos.

Ultimamente, têm sido aplicados fungicidas como benomyl e metil-tiofanato, que são considerados sistêmicos, e, mais recentemente, triadimefon (Silva 1979), com a expectativa de translocação para os novos lançamentos das plantas jovens com gema apical em início de atividade. No entanto, a maior parte da informação sobre translocação de fungicidas sistêmicos em seringueira tem sido inferida pelo maior ou menor grau de surto epidêmico

¹ Aceito para publicação em 19 de maio de 1980. Trabalho realizado com a participação financeira do Convênio SUDHEVEA/EMBRAPA.

² Biól. M.Sc., Centro Nacional de Pesquisa da Seringueira (CNPSe) - EMBRAPA, Caixa Postal 319, CEP 69.000 - Manaus, AM.

das folhas e não através de evidências mais diretas sobre seu transporte.

O presente trabalho descreve, preliminarmente, os resultados, obtidos mediante cromatografia de camada fina e bioautografia, da persistência e da translocação do metil-tiofanato (MT), (1,2 bis - { 3-metoxicarbonil 2 - tiureido } - benzeno); do benomyl (metil - 1 { butil-carbamil } - 2-benzimidazole - carbamato) e do triadimefon, (1 { 4 - clorofenoxil 3,3-dimetil } - 1 { 1-H-1, 2, 4-triazol 1 il } - 2 butanon), recomendados no campo agrônômico pela sua ação fungitóxico-sistêmica.

MATERIAL E MÉTODOS

No campo

O presente experimento foi conduzido em Manaus, no Campo Experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira (CNPSe), situado no km 28 da rodovia AM-010, durante o período de 21 de novembro a 21 de dezembro de 1978, em plantas de viveiro de *Hevea brasiliensis* (Muel.) Arg., de nove meses de idade, de altura semelhante, e com gemas apicais recém-entumescidas, porém próximas a um novo lançamento. Foram aplicadas, por uma única vez, 6,3 g de metil-tiofanato, 1,5 g de benomyl e 0,75 g de triadimefon por três litros de água, respectivamente, mais espalhante adesivo, mediante pulverizador costal motorizado Hatsuta. O jato pulverizador, a 2 m de distância, foi dirigido às folhas do último lançamento durante dez segundos. O experimento teve duas repetições, sendo que em cada uma delas foram usadas 20 plantas, das quais cinco foram distribuídas para cada um dos fungicidas, e cinco para o controle.

Os dados climatológicos foram registrados diariamente, durante todo o período de experimentação. As médias correspondentes ao término dos primeiros quinze dias foram: 27°C, 73 mm de precipitação (seis dias com chuvas) e 81% de umidade relativa (UR) do ar.

No laboratório

Com ligeiras modificações, a persistência e a translocação nos fungicidas foram detectadas pela técnica bioautográfica usada por Peterson & Edgington (1969).

No estudo da persistência, a cada sete dias, e por um período de 28 dias, após a pulverização das plantas, foram coletadas ao acaso, do primeiro ou do segundo folíolo, no sentido acrópeto, 5 g de peso fresco de folhas do penúltimo lançamento que tinham recebido cada um dos diferentes fungicidas. Entretanto, a translocação foi pesquisada aos 7, 14 e 21 dias nas folhas do último lançamento. Aos sete dias, coletou-se, aleatoriamente, 1 g delas, e nos outros dias, 5 g.

Na preparação dos extratos, as folhas foram pesadas e lavadas em água bidestilada; em seguida, foram secas com

papel-toalha, e, depois, trituradas num almofariz, até obter-se uma massa homogênea. Foram preparados quatro extratos, correspondentes ao controle e aos fungicidas. Tanto os extratos das folhas do controle quanto os das folhas tratadas com metil-tiofanato e benomyl foram feitos com clorofórmio, enquanto o triadimefon foi feito com metanol - água 50% (v/v). A seguir, os extratos foram separadamente filtrados em funis contendo cinco camadas de gases. A 45°C, os filtrados foram submetidos a evaporizador rotativo sob pressão reduzida e o resíduo re-suspenso com 5 ml de clorofórmio ou de metanol 50%.

Para a realização da cromatografia, feita em placas de sílica-gel com 20 cm x 20 cm e 0,25 mm de espessura de camada, foram colocados 10 microlitros de cada um dos extratos. Previamente, as placas foram secas em estufas a 105°C, durante 30 minutos, e esfriadas em dessecador de sílica-gel (Valarezo 1963). A separação cromatográfica foi feita em acetona, e, após 30 minutos aproximadamente, quando a frente do solvente atingiu 16 cm, as placas foram retiradas das cubas e postas a secar à temperatura ambiente. Fizeram-se, também, ensaios cromatográficos com soluções-padrões de metil-tiofanato, benomyl e triadimefon em concentração de 0,035% (ingrediente ativo), a partir de suas respectivas formulações comerciais, na forma de pó molhável.

Para a aplicação dos esporos nos cromatogramas, 50 ml de uma suspensão ($4,5 \times 10^4$ esporos/ml) do fungo *Aspergillus niger*, mantido em BDA (batata, dextrose e ágar), foram adicionados a uma mistura de 14 g de farinha de trigo, 7 g de celulose e 5 g do concentrado protéico-dietético Bionorm (Merck), finamente moído. A pasta formada foi espalhada horizontalmente na superfície de uma placa cromatográfica, com auxílio de um bastonete de vidro. Depois, ela foi colocada em uma câmara úmida à temperatura ambiente e ali conservada até a germinação dos esporos, que ocorreu em aproximadamente 48 horas, anotando-se, em cada caso, os R_f das áreas fungitóxicas.

RESULTADOS

Em relação à translocação, aos 7, 14 e 21 dias após a pulverização das plantas, não foram observadas zonas de inibição do crescimento do fungo nos cromatogramas (Fig. 1); portanto, não houve diferenças entre as amostras e o controle. Estes resultados estão de acordo com o fato de que, em geral, no viveiro, as folhas do último lançamento das plantas sob tratamento foram severamente atacadas pelo *M. ulmi*, ao ponto de apresentar, aos 30 dias, abundantes quantidades de lesões e estromas (Fig. 2 e 3), além de desfolhamento. Semelhantes características foram observadas também nas testemunhas. Fazem exceção a esta descrição apenas uns 30% das plantas tratadas com metil-tiofanato, que não apresentaram sintomas de doenças; não

obstante, nos 70% restantes, a incidência de ataque estendeu-se até a queda foliar.

Na persistência, nas áreas das placas correspondentes ao triadimefon, não foram observadas zonas de inibição ao desenvolvimento do fungo aos 7, 14, 21 e 28 dias; entretanto, foram detectadas nas faixas relativas ao metil-tiofanato (até aos quatorze dias) e benomyl (até aos 21 dias) (Figs 4 e 5), apresentando, em média, ambos os compostos, um R_f de 0,71, enquanto que nas soluções-padrões o R_f dos três fungicidas, em média, foi de 0,75.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos referentes à translocação (Fig. 1) sugerem que não houve uma sensível transferência dos fungicidas para as folhas do topo das plantas. A julgar pela intensidade da epidemia aos 30 dias (Fig. 2 e 3), infere-se que as condições ambientais dos primeiros quinze dias estimularam a propagação do fungo (liberação de ascósporos), aumentando o potencial de inóculo nas folhas novas. A proximidade das plantas no viveiro, a impor-

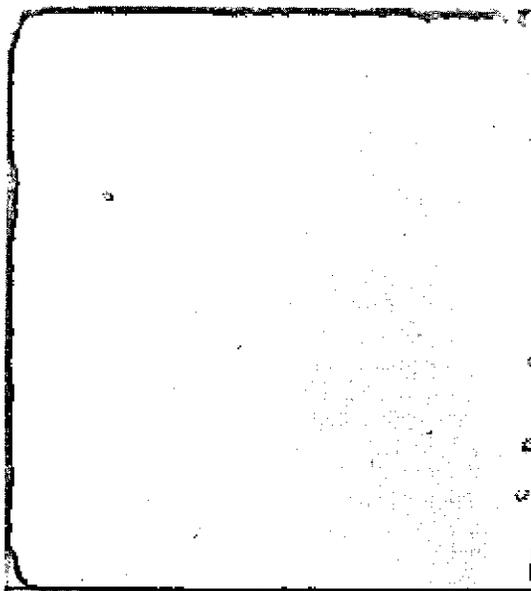


FIG. 1. Cromatograma com extrato de folhas do último lançamento aos 7 dias. Ausência de manchas fungitóxicas. Similares cromatogramas foram obtidos aos 14 e 21 dias.



FIG. 2 e 3. Folhas do último lançamento de planta tratada com benomyl (E) e triadimefon (D), após 30 dias. Presença de lesões e estromas.

tância das chuvas na remoção dos ascósporos (Chee 1977) e a falta de proteção dos folíolos novos resultaram no alastramento de "queima foliar" dos lançamentos. Chee (1978) não encontrou evidência na mobilidade de metil-tiofanato e benomyl em seringueira; no entanto, Van Alfen & Walton (1974) verificaram uma fraca translocação do benomyl no sistema vascular de *Ulmus americana*, ao passo que as evidências fornecidas por Hardison (1971) sobre a mobilidade de metil-tiofanato, podem ser consideradas circunstanciais. Estes antecedentes estão de acordo com o fato de que metil-tiofanato e benomyl, ou então metil-2-benzimidazol-carbamato, MBC (Sijpesteijn 1972) persistiram na folha durante duas e três semanas, respectivamente (Fig. 4 e 5). A proximidade entre os R_f (0.71 - 0.75) e as áreas tóxicas para *A. niger* suportam a evidência da presença destes compostos nas folhas do penúltimo lançamento. A Fig. 6 sugere que este desdobramento também pode acontecer num solvente orgânico, fenômeno já descrito por outros pesquisadores (Peterson & Edgington 1969; Kirkpatrick & Sinclair 1973).

Do ponto de vista da hipótese do fluxo massal, caberia esperar uma translocação destes solutos em resposta ao gradiente de concentração fonte-dreno (folhas do penúltimo e último lançamento respectivamente). Com base nos resultados de Alvim & Machado (1967), é possível supor que as raízes tenham-se comportado como um dreno mais poderoso, favorecendo a mobilidade de metil-tiofanato após os quatorze dias, e a de benomyl, após 21 dias, no sentido preferentemente basípeto em lugar do acrópeto. No caso de Triadimefon, pode ser que isso tenha acontecido antes dos sete dias, motivo pelo qual não foi detectado nos cromatogramas. Em virtude das diferentes taxas de translocação dos solutos no floema, causadas presumivelmente pela dificuldade de entrar nos tubos crivados (Leopold & Kriedemann 1975), esta suposição pode ser válida. Em discrepância com este ponto de vista, Peterson & Edgington (1970) verificaram em *Phaseolus vulgaris* que a presença do MBC no floema devia-se a uma transferência lateral desde o xilema e não a uma translocação desde cima.

Uma outra alternativa, admitida por Dekker (1972) e Brown (1974), refere-se à inativação, no tecido, do princípio ativo do fungicida, com a con-

comitante perda da atividade fungitóxica. Nesta perspectiva o triadimefon seria o mais suscetível, enquanto que os outros seriam mais estáveis. Contudo, é clara uma paulatina diminuição nas áreas tóxicas dos cromatogramas, o que pode ser interpretado como uma diluição das suas concentrações nas folhas (Fig. 4 e 5). Sims et al. (1969) verificaram que o MBC estava presente, ainda, quatro semanas após a aplicação de benomyl em algodoeiro. Considerando que a eficiência no controle dependa ainda, de outros fatores, sugere-se levar em conta esse efeito de persistência na programação de controle da doença, pois entre outras razões, segundo Swinburne 1975, os derivados benzimidazólicos podem reduzir a atividade da fenilalanina amonilíase, enzima esta considerada chave na formação de compostos aromáticos, muitos dos quais apresentam uma efetiva ação fungitóxica (fitoalexina). Contudo, uma única aplicação de triadimefon poderia ter sido insuficiente para sua penetração na folha, considerando-se que a cutícula constitui

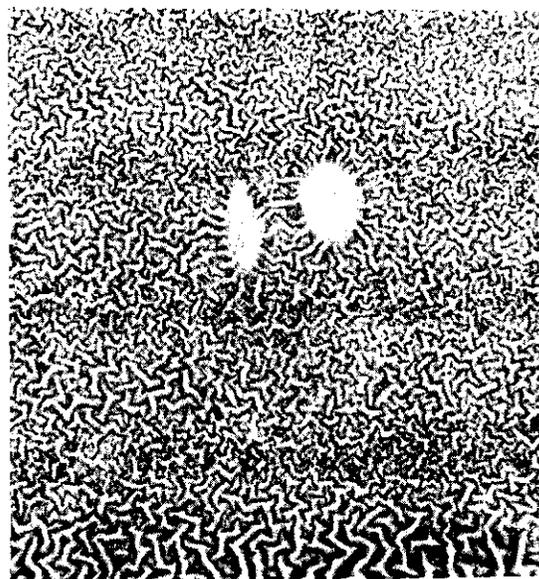


FIG. 4. Cromatograma com extratos de folhas do penúltimo lançamento, aos 7 dias. Presença de manchas fungitóxicas correspondentes a metil-tiofanato (E) e benomyl (D); e ausência de zonas de inibição para triadimefon e testemunha.

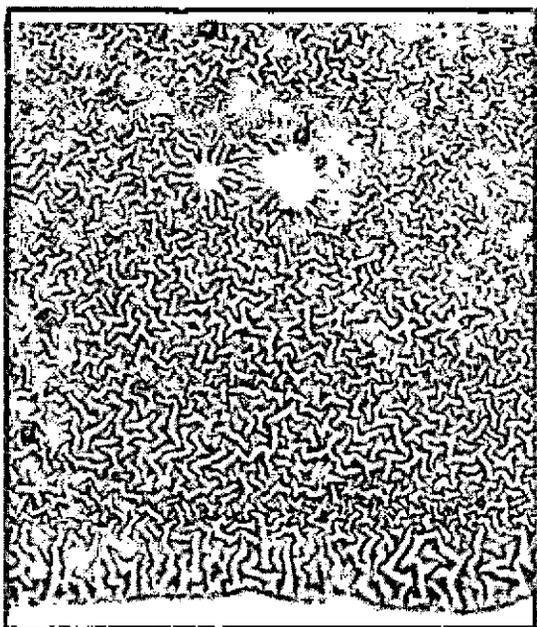


FIG. 5. Cromatograma com extratos de folhas do penúltimo lançamento, aos 14 dias. Presença de manchas fungitóxicas correspondentes a metil-tiofanato (E) e benomyl (D), e ausência de zonas de inibição para triadimefon e testemunha. Aos 21 dias, o cronograma registrou apenas mancha correspondente a benomyl.

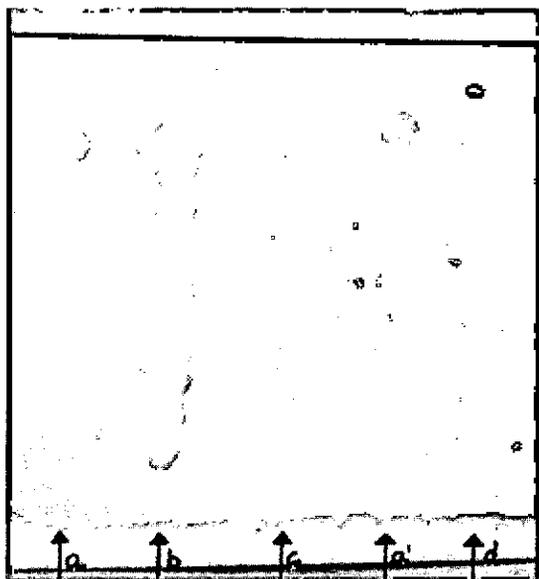


FIG. 6. Cromatograma das soluções-padrões dos fungicidas a e à: triadimefon; b: benomyl; c: metil-tiofanato; e d: testemunha.

importante barreira à difusão de certos compostos. Por outro lado, a natureza não anfiestomática da folha de seringueira (Bobiloeff 1923) dificultaria, ainda mais, esta penetração.

Uma conseqüência direta da não-aplicação dos fungicidas nas folhas-testemunhas foi a não-visualização, pela bioautografia, de zonas de inibição no crescimento do fungo. Este fato pode ser um reflexo da "aptidão" destas plantas para serem colonizadas pelo *Microcyclus ulei*, cuja interação, - à luz dos atuais conceitos sobre lectinas e/ou fitoalexinas na problemática do mecanismo de resistência à doença (Callow 1977) -, não tem sido suficientemente pesquisada.

CONCLUSÕES

1. Não houve uma sensível translocação dos fungicidas testados na direção dos novos lançamentos.
2. A fitotoxicidade encontrada nas placas sugere a presença de metil-tiofanato e benomyl, ou então um composto relacionado com eles, nas folhas do penúltimo lançamento.
3. Em ordem decrescente, a persistência dos fungicidas nas folhas foi: benomyl, metil-tiofanato e triadimefon.
4. Um bom controle sobre a doença pode ser conseguido levando-se em consideração este efeito de persistência.

AGRADECIMENTOS

Ao Eng^o Agr^o Vicente Aroldo de Figueiredo Moraes, pesquisador do CNPSe, pelas oportunas sugestões durante a realização deste trabalho, e à Sra. Antonieta Martins, Laboratorista, pela colaboração nos trabalhos de laboratório.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, P. de T. & MACHADO, A.D. Estudo comparativo do crescimento e nutrição mineral de plântulas de cacauero (*Theobroma cacao*) e seringueira (*Hevea brasiliensis*). *Inf. Téc. CEPEC*, 26-7, 1967.
- BOBILIOFF, W. *Anatomy and physiology of Hevea brasiliensis*. Zurich, Art. Institut Orell Füssli, 1923, p. 133.
- BROWN, G.E. Benomyl residues in valencia oranges from postharvest applications containing emulsified oil. *Phytopathology*, 64:539-42, 1974.
- CALLOW, J.A. Recognition, resistance and the role of plant lectins in host parasite interactions. *Adv. Bot. Res.*, 4:2-44, 1977.

- CHEE, K.H. Combating South American leaf blight of *Hevea* by plant breeding and other measures. *Planter*, Kuala Lumpur, 53:287-96, 1977.
- _____. Evaluation of fungicides for control of South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*. *Ann. App. Biol.* 90:51-8, 1978.
- DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R.W. ed. *Systemic fungicides*. London, Longman, 1972. p. 167.
- HARDISON, J.R. Control of *Ustilago striiformis* and *Urocystis agropyri* in *Poa pratensis* by thiophanate fungicides. *Phytopathology*, 61:1462-64, 1971.
- KIRKPATRICK, B.L. & SINCLAIR, J.B. Uptake of two systemic fungicides and their breakdown products by soybean seeds. *Phytopathology*, 63:1532-5, 1973.
- LEOPOLD, A. & KRIEDEMANN, P.E. Vascular translocation. In: _____. *Plant growth and development*. 2. ed. New Delhi, McGraw-Hill, 1975. p. 41-76.
- MANÇO, G.R. Determinação da incidência de *M. ulei* nos clones de seringueira Fx 25 e IAN 717 na Bahia. *Inf. Téc. CEPEC*, 43-5, 1967.
- MEDEIROS, A.G. Novos conceitos técnicos sobre controle químico do "mal das folhas" da seringueira. *B. Téc. CEPLAC*, Itabuna, 35:20, 1976.
- PETERSON, C.A. & EDGINGTON, L.V. Quantitative estimation of the benomyl using a bioautograph technique. *J. Agr. Food Chem.*, 17:898-9, 1969.
- _____. Transport of the systemic fungicide benomyl in bean plants. *Phytopathology*, 60:475-8, 1970.
- ROCHA, H.M.; MEDEIROS, A.G. & VASCONCELOS, A.P. Comparação de fungicidas para controle do "mal das folhas" de seringueira (*M. ulei*) (P. Henn) V. Arx. em viveiro. *Fitopatol. bras.*, 3:163-7, 1978.
- SIJPESTEIJN, A.K. Effects on fungal pathogens. In: MARSH, R.W. ed., *Systemic fungicides*. London, Longman, 1972. p. 13.
- SILVA, H.M. Mancha areolada da seringueira. *Com. Téc. CNPSe*, Manaus, 10, 1979. Prelo.
- SIMS, J.J. MEE, H. & ERWIN, A.C. Methyl 2-benzimidazole carbamate, a fungitoxic compound isolated from cotton plants treated with methyl 1 (butyl carbamoyl)-2-benzimidazole carbamate (benomyl). *Phytopathology*, 59:175-6, 1969.
- SWINBURNE, T.R. The effect of benomyl and other fungicides on phenylalanine-ammonia-lyase. *Physiol. Plant Pathol*, 5:81-8, 1975.
- VALAREZO, L. Técnica de cromatografia em capa delgada. *Cienc. Nat.*, 6:77-81, 1963.
- VAN ALFEN, N.K. & WALTON, G.S. Pressure injection of Dutch Elm Disease. *Phytopathology*, 64:1231-4, 1974.