

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**SENSIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ISOLADOS
DE *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.)
Briosi & Cav., A FUNGICIDAS SISTÊMICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Almeida Gulart

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**SENSIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ISOLADOS
DE *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.)
Briosi & Cav., A FUNGICIDAS SISTÊMICOS**

por

Caroline Almeida Gulart

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia.**

Orientador: Prof. PhD. Ricardo Silveiro Balardin

Santa Maria, RS, Brasil

2009

© 2009

Todos os direitos autorais reservados a Caroline Almeida Gulart. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Av. Roraima, Depto de Defesa Fitossanitária, prédio 42, sala 3225. Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900.

Fone: (0xx) 55 96215945 - E-mail: *carolgulart@yahoo.com.br*

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SENSIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ISOLADOS DE
Colletotrichum lindemuthianum (Sacc & Magn.) Briosi & Cav., A
FUNGICIDAS SISTÊMICOS**

elaborada por
Caroline Almeida Gulart

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ricardo Silveiro Balardin, PhD.
Presidente/Orientador

Ivan Francisco Dressler da Costa, Dr. (UFSM)

Luis Aquiles Martins Medeiros, Dr. (CEFET/SVS)

Santa Maria/RS, 18 de fevereiro de 2009

DEDICATÓRIA

*A meus amados sobrinho LUCAS e
afilhada JULIA ANY
Dedico e ofereço*

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me fazer escolher sempre o caminho certo.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido à realização deste trabalho e a Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade.

Ao professor RICARDO BALARDIN pela orientação, apoio, lições e principalmente oportunidade.

À CLARICE BALARDIN pelo apoio, amizade e confiança.

Ao meu amigo e co-orientador IVAN DRESSLER pela amizade, motivação, e pelo apoio durante a graduação e também durante o mestrado.

Aos Pesquisadores DRA. MARGARIDA FUMIKO ITO (IAC), DRA. ELAINE SOUZA (UFLA), DR. ALOÍSIO SARTORATO (CNPAF/EMBRAPA) e especialmente meu co-orientador DR. JOÃO WORDELL (EPAGRI), pelo envio dos isolados que possibilitaram este trabalho e também pela disponibilidade e apoio constantes.

Aos colegas e amigos do Instituto Phytus: ANDREZA, LUCAS (VANDECO), MÔNICA, MARCELO TEMP, ROSANA, DANIEL, DIEGO, ANDRÉ, NÉDIO, FELIPE e CLÁUDIA, pelo apoio e agradável convivência.

Aos Funcionários do Instituto Phytus VANI, EDUARDO e ANTÃO pelo apoio e amizade.

À minha colega e grande amiga BETÂNIA, pela amizade, carinho e atenção em todos os momentos!

Aos amigos do Departamento de Defesa Fitossanitária: ANGELITA, MARIZETE, FERNANDO, TIA ZILMA, MARIA, JORGE, PROF. COSTA, JAQUES, PROF. GUEDES, PROF. SÉRGIO E PROF. LINK pela convivência, amizade e cooperação durante os anos de convivência nesse departamento.

Aos colegas e amigos da confraria PhV: CARLA, DANI, TÂNIA, MARCELO MADALOSSO, LUCAS NAVARINI, GISLENE, SANDRO e GIUVAN pela parceria e momentos de descontração que foram essenciais para superação dos momentos mais difíceis dessa etapa.

À minha querida TIA LENA pelo constante apoio e carinho em todos os momentos em que precisei.

À minha querida VÓ MARIA pela constante atenção e dedicação.

Aos meus pais FERNANDO e MARIA DO CARMO, minhas irmãs LIVIA e PAULA, pela força, apoio e amor.

Ao meu namorado EROCI pelo amor, incentivo e compreensão

Aos colegas JULIANO (JUCA) e GERSON pela ajuda na condução do trabalho e análise dos dados e principalmente por me fazerem sempre ver o lado positivo das coisas. Vocês foram determinantes!

Aos primos Luiz Alberto e Andréa pela oportunidade dada, sem a qual talvez eu não chegasse até aqui.

Aos meus tios Adair, Ione, Adão, Jurema, Abel e Guiomar; Cacao e Nice. Meus cunhados: Pedro e Marcelo pelo incentivo, apoio e vibração a cada vitória conquistada.

Aos tios Rubens e Solange pelo exemplo e constante estímulo aos estudos, que foram essenciais para o meu crescimento.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

SENSIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav., A FUNGICIDAS SISTÊMICOS

AUTORA: CAROLINE ALMEIDA GULART

ORIENTADOR: RICARDO SILVEIRO BALARDIN

DATA E LOCAL DA DEFESA: SANTA MARIA 18 DE FEVEREIRO DE 2009.

A sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de dez isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas sistêmicos foi avaliada *in vitro* e *in vivo*, em delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. No estudo *in vitro* foi avaliada a porcentagem de germinação de conídios do fungo quando submetidos aos fungicidas benzimidazóis: carbendazin e tiofanato metílico e estrobilurinas: azoxistrobina e piraclostrobina. Foi utilizada a metodologia do fungicida incorporado ao agar nas concentrações finais de 0; 0,1; 1,0; 10 e 100 ppm. Com os dados de germinação foi calculada a DL_{50} (dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de esporos) para cada fungicida, sendo observadas diferenças na sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* com relação aos fungicidas testados. Considerando o fungicida carbendazin, a raça 65 apresentou baixa sensibilidade enquanto as raças 08, 81, 321 foram moderadamente sensíveis a este fungicida. No caso das estrobilurinas, todos os isolados mostraram-se altamente sensíveis aos fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina, comprovando o efeito esporocida desse grupo químico. Na avaliação *in vivo*, foi avaliada a DL_{50} considerando as lesões de *C. lindemuthianum* formadas a partir da inoculação de uma concentração conhecida de esporos em folhas destacadas de feijão submetidas a concentrações finais de 0; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 50,0 ppm de tebuconazole e epoxiconazole. Não houve diferença quanto à classificação de sensibilidade proposta na escala adaptada de Edgington et al. (1971), embora tenha sido verificada grande amplitude de valores de DE_{50} entre os isolados. A raça 321 apresentou moderada sensibilidade a epoxiconazole, ficando as raças 08 e 65 com valores de DE_{50} relativamente maiores. O mesmo ocorreu com a raça 81 com relação ao epoxiconazole. A alteração na sensibilidade de isolados de *C. lindemuthianum* quando submetidos ao grupo dos benzimidazóis está relacionada a origem, frequência e pressão de seleção imposta pela aplicação repetida desses fungicidas em determinados locais onde predominam determinados grupos de raças fisiológicas. Com relação aos triazóis não houve diferenças na classificação de sensibilidade entre os isolados, mostrando que a utilização desses fungicidas no controle da antracnose não produziu um efeito seletivo similar ao observado com os fungicidas tebuconazole e epoxiconazole, considerando a mesma população do patógeno.

Palavras-chave: antracnose do feijão, resistência de fungos a fungicidas, estrobilurinas, triazóis, benzimidazóis, DL_{50} .

ABSTRACT

Master of Science Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

SENSIBILITY *IN VITRO* and *IN VIVO* OF *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav., THE SYSTEMIC FUNGICIDES

AUTHOR: CAROLINE ALMEIDA GULART

ADVISER: RICARDO SILVEIRO BALARDIN

DATE AND PLACE OF EXAMINATION: SANTA MARIA, FEBRUARY, 18 TH, 2009

The sensitivity of ten isolated of *Colletotrichum lindemuthianum* the systemic fungicides was evaluated *in vitro* and *in vivo*, in experimental design was completely random with three replications. In the study *in vitro*, it was evaluated the percentage of germination of spores of the fungus when submitted to the benzimidazol fungicides: carbendazin and methyl tiophanate and the estrobilurins: azoxystrobin and pyraclostrobina. The methodology consisted in incorporate the fungicide to the agar at the final concentrations of 0; 0,1; 1,0; 10 and 100 ppm. With the germination data the DL₅₀ (rate capable to inhibit 50% of the germination of spores) was calculated. For each fungicide was calculated the DL₅₀, being observed differences in the sensitivity of isolated of *C. lindemuthianum*. Considering the fungicide carbendazin, race 65 presented low sensitivity while races 08, 81, 321 had been moderately sensible to this fungicide. In the case of the estrobilurins, all the isolated ones had revealed highly sensible to the fungicides azoxystrobin and pyraclostrobin, proving the effect of this chemical group on the germination of spores. In the *in vivo* evaluation, it was evaluated the DL₅₀ having considered the injuries of *C. lindemuthianum* formed from the inoculation of a known concentration of spores in detached bean leaves submitted to the final concentrations of 0; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 and 50,0 ppm of tebuconazol and epoxiconazol. It was not observed difference among isolates, considering the classification of sensitivity proposed by Edgington al. (1971). However, it was verified great amplitude of values of DE₅₀ between the isolated ones. Race 321 presented moderate sensitivity to the epoxiconazol, races 08 and 65 with relatively bigger values of DE₅₀. The same occurred with race 81 with regard to epoxiconazol. The alteration in the sensitivity on *C. lindemuthianum* isolates, when submitted to the group of the benzimidazoles, was related to the frequency and pressure of selection imposed by repeated fungicides application. Regarding the triazoles, it was not observed differences in the classification of sensitivity between the isolates, showing that the use of these fungicides in the control of anthracnose did not produce a similar selective effect as observed with the fungicides tebuconazol and epoxyconazol.

Keywords: anthracnose in bean, fungal fungicide resistance, estrobilurins, triazoles, benzimidazoles, DE₅₀.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Porcentagem de germinação de conídios do isolado CL 837 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	35
FIGURA 2 Porcentagem de germinação de conídios do isolado CL 1135 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	36
FIGURA 3 Porcentagem de germinação de conídios do isolado W 25 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	37
FIGURA 4 Porcentagem de germinação de conídios do isolado W 183 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	38
FIGURA 5 Porcentagem de germinação de conídios do isolado B 01 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	39
FIGURA 6 Porcentagem de germinação de conídios da raça 08 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	43
FIGURA 7 Porcentagem de germinação de conídios da raça 65 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	44
FIGURA 8 Porcentagem de germinação de conídios da raça 81 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	45
FIGURA 9 Porcentagem de germinação de conídios da raça 321 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	46
FIGURA 10 Porcentagem de germinação de conídios da raça 337 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.....	47
FIGURA 11 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , raça 321, submetidos a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	53
FIGURA 12 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , raça 08, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	53
FIGURA 13 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , raça 65, submetidos a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	54
FIGURA 14 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , raça 81, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.	54

FIGURA 15 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , isolado CL 837, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	56
FIGURA 16 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , isolado CL 1135, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	56
FIGURA 17 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , raça 337, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	57
FIGURA 18 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , isolado W 25, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	57
FIGURA 19 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , isolado W 183, submetidos a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	58
FIGURA 20 Número de lesões por trifólio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , isolado B 01, submetidos a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Identificação e origem dos isolados utilizados. Santa Maria, 2009.....	25
TABELA 2 Fungicidas dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação do isolado CL 837.....	32
TABELA 3 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação do isolado CL 1135.....	32
TABELA 4 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação da raça 08.....	33
TABELA 5 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação da raça 65.....	33
TABELA 6 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação da raça 81.....	33
TABELA 7 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação da raça 321.....	33
TABELA 8 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação da raça 337.....	34
TABELA 9 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação do isolado W 25.....	34
TABELA 10 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação do isolado W 183.....	34
TABELA 11 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , e classificação do isolado B 01.....	34
TABELA 12 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% do aparecimento de lesões, e classificação dos isolados. Santa Maria, RS. 2009.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 ANTRACNOSE DO FEIJÃO.....	17
2.1.1 Manejo integrado da doença.....	18
2.1.2 Variabilidade genética em <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	18
2.1.3 Resistência de fungos a fungicidas.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 METODOLOGIA GERAL.....	25
3.1.1 Origem dos isolados.....	25
3.1.2 Cultivo dos isolados.....	25
3.1.3 Confirmação da reação fisiológica dos isolados.....	26
3.1.4 Manutenção de isolados originais.....	26
3.1.5 Avaliação <i>in vitro</i>	27
3.1.5.1 Porcentagem de germinação.....	27
3.1.6 Avaliação <i>in vivo</i>	27
3.1.7 Estatística: delineamento e análise.....	28
3.2 METODOLOGIA ESPECÍFICA.....	28
3.2.1 EXPERIMENTO 1: Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> a fungicidas.....	28
3.2.2 EXPERIMENTO 2: Sensibilidade <i>in vivo</i> de isolados de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	30
4 EXPERIMENTO 1: Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> a fungicidas.....	32
4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5 EXPERIMENTO 2: Avaliação <i>in vivo</i> da sensibilidade de isolados de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> a fungicidas triazóis.....	50
5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÕES	59
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O feijão é cultivado em diversas regiões do país revestindo-se de grande importância social e econômica. Tem sido cultivado geralmente tanto em sistemas agrícolas altamente tecnificados como em pequenas propriedades com limitada utilização de tecnologia. Por ser cultivado durante 2 safras por ano e apresentar-se sensível a mais de 240 patógenos, a cultura se depara com uma infinidade de fatores fitossanitários limitantes a sua produção. As doenças, particularmente, são responsáveis por significativos danos na cultura, principalmente quando não são tomadas medidas apropriadas de controle (EMBRAPA, 2003).

O feijão é hospedeiro de doenças de origem bacteriana, virótica ou fúngicas. Dentre as principais doenças destacam-se a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), mosaico comum (*Bean Common Mosaic Virus*), mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) e antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). O controle destas doenças é obtido através do tratamento de sementes, rotação com culturas não hospedeiras, enterrio de restos culturais, época de semeadura, resistência varietal e controle químico (RAVA et al., 1994).

A utilização do controle químico é em muitas situações, a única forma eficiente de controle para diversos problemas fitossanitários. No tocante aos fungicidas, resultados imediatos bem como a facilidade de sua aplicação, tornam sua utilização amplamente difundida (GHINI; KIMATI, 2000). No caso da antracnose, por ser uma doença transmitida pela semente e de taxa de progresso elevada, é facilmente introduzida e disseminada na lavoura. Sob circunstâncias favoráveis, o uso de fungicidas torna-se a única alternativa viável.

Por outro lado, a intensa utilização de fungicidas, principalmente, se pertencentes ao mesmo grupo químico, desencadeia um dos principais problemas ligados ao controle químico dentro das premissas da agricultura moderna, a resistência de fungos a fungicidas. Modernamente, alguns pesquisadores tem se referido ao fenômeno da resistência como uma perda de sensibilidade dos fungos aos produtos, resultando em uma diminuição da eficiência destes sob condições de campo (GHINI; KIMATI, 2000).

De maneira geral, pode-se dizer que o fenômeno da resistência teve início com o surgimento dos fungicidas sistêmicos, tendo em vista seu mecanismo de ação ser definido como “sítio – específico”, ou seja, o fungicida agindo em apenas determinadas rotas metabólicas dos fungos.

O que se tem hoje com relação a este tema é um grande número de trabalhos que apenas relatam a ocorrência de resistência de diversos fungos a alguns fungicidas (CASA et al, 2002; RODRIGUES et al, 2007), e também diversos trabalhos que avaliam a sensibilidade *in vitro* de fungos a fungicidas utilizados a campo para o controle das doenças (BALARDIN; RODRIGUES, 1995; FERREIRA et al, 2006; STOLTE, 2006). Entretanto, é possível observar que nem sempre estes trabalhos são realizados com uma metodologia adequada para detectar alelos mutantes em populações de patógenos.

Conhecimento detalhado sobre o modo de ação dos fungicidas aliado a um correto monitoramento das populações de patógenos, especialmente aquelas com ampla mutabilidade, caso de *Colletotrichum lindemuthianum* é de fundamental importância visando longevidade da eficácia dos fungicidas utilizados no controle de doenças.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade de isolados e raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas sistêmicos utilizados no controle da antracnose do feijão, bem como identificar a existência de alelos mutantes (*mut^r*) tolerantes aos fungicidas utilizados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANTRACNOSE DO FEIJÃO

A antracnose é certamente uma das doenças que causa maior impacto sobre a produtividade do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. & Cav., é responsável por prejuízos de até 76% (BALARDIN¹, informação pessoal), especialmente quando sob condições favoráveis para um rápido progresso da doença.

As condições favoráveis para o desenvolvimento da epidemia são temperatura entre 18 e 22°C, umidade relativa acima de 91 % (ZAUMAYER; THOMAS, 1957; SCHWARTZ; GALVEZ, 1980, BALARDIN, 1997); período de molhamento foliar entre 18 e 24 horas (PRIA et al., 2003), chuvas e ventos constantes (SCHWARTZ; GALVEZ, 1980).

Em estudos realizados para verificar a influência das variáveis ambientais no aumento da severidade da antracnose, Garcia et al. (2007) observaram que a temperatura possui efeito limitante na curva de progresso da doença, e que quando acima dos 27°C, proporciona ambiente desfavorável a sua evolução. Esta constatação já havia sido feita por Rahe; Kuae (1970), onde relataram uma diminuição do número e tamanho de lesões da antracnose com o aumento da temperatura de incubação, numa faixa de 28 a 32°C.

Os danos causados pelo patógeno vão desde a plântula, onde o fungo ataca cotilédones e hipocótilos, até a planta adulta, onde causa danos no pecíolo, limbo foliar e mais tarde nas vagens, comprometendo, desta forma a produção de sementes (POMPEU et al., 1992; RAVA et al., 1994; BALARDIN, 1997). A semente infectada, de variedades suscetíveis é importante fonte de inóculo primário da doença, fato que torna difícil o seu controle e facilita enormemente a sua disseminação a longas distâncias. A sintomatologia da doença é bem característica nos cotilédones, onde são observadas lesões deprimidas de coloração marrom e bordos escuros. Na parte aérea da planta aparecem manchas necróticas de coloração marrom com bordos avermelhados e principalmente lesões escurecidas nas nervuras da parte inferior, que são características desta doença (ZAUMAYER; THOMAS, 1957; BALARDIN, 1997). A maior problemática com a antracnose do

feijoeiro se dá nos cultivos quando a semeadura e as fases fenológicas iniciais da cultura coincidem com baixas temperaturas e alta umidade.

2.1.1 Manejo integrado da doença

Para um eficiente controle da antracnose, são recomendadas medidas integradas, destacando-se a utilização de sementes livres do patógeno e tratadas com fungicidas, rotação de culturas com plantas não hospedeiras por um período de 2 a 3 anos, resistência varietal e o controle químico (RAVA et al., 1994). Dentre os produtos químicos registrados para o controle da antracnose do feijão pode-se citar do grupo das estrubilurinas: azoxistrobina, trifloxistrobina, e piraclostrobin; do grupo dos triazóis, propiconazol, epoxiconazol, tebuconazol e difenoconazol. Do grupo dos benzimidazóis: tiofanato metílico, carbendazin; além de outros produtos de outros grupos químicos como o chlorothalonil (isoflortalonitrila), (AGROFIT, 2009).

A resistência varietal é considerada a forma mais viável economicamente para o controle da antracnose, entretanto a ampla variabilidade genética de *Colletotrichum lindemuthianum*, freqüentemente proporciona a quebra de resistência das cultivares recomendadas ainda nos primeiros cultivos (ANDRUS; WADE, 1942; BALARDIN et al., 1990). Barrus (1911) observou que a estabilidade e longevidade da resistência dependem da variação genética de *C. lindemuthianum*, representada pela sua especialização fisiológica e pela habilidade dos isolados apresentarem patogenicidade diferenciada para cada variedade de feijão.

Diante das dificuldades relacionadas à estabilidade enfrentadas pelos programas de melhoramento, o uso de fungicidas torna-se inevitável, sendo uma das medidas mais utilizadas para o controle da doença (COMISSÃO, 2003), e que de certa forma, é uma medida que diminui a pressão de seleção do patógeno, contribuindo para a durabilidade da resistência de uma cultivar.

2.1.2 Variabilidade genética em *Colletotrichum lindemuthianum*

A variabilidade genética presente na população deste patógeno, vem sendo estudada desde 1911, quando foram identificadas as raças alfa e beta (BARRUS,

1911). A partir desta data diversos relatos quanto a identificação de novas raças foram feitos em todo o mundo (BALARDIN; KELLY, 1997). Em um dos maiores levantamentos já realizados, quarenta e um patótipos foram caracterizados a partir de 138 isolados coletados na Argentina, Brasil, República Dominicana, Honduras, México e Estados Unidos (BALARDIN; KELLY, 1998). Estes foram designados de acordo com o “pool” gênico de origem do hospedeiro, e nominados como patótipos Andinos e Mesoamericanos.

Somente os patótipos 7, 65, e 73 mostraram ampla distribuição, sendo encontrados na América do Norte, Sul e Central. Os patótipos 7, 64, 65, e 73 também foram identificados nos Estados Unidos (ANDRUS; WADE, 1942). No México, trinta e cinco novos patótipos foram identificados, além de onze patótipos, oriundos de uma coleção de variedades selvagens de *Phaseolus vulgaris* (GONZALEZ et al., 1998). Em levantamento realizado em oito regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul, Somavilla; Prestes (1999), relataram a ocorrência de onze patótipos do patógeno (5, 23, 64, 65, 67, 73, 81, 83, 87, 89 e 321), sendo a primeira vez relatada a raça 321 nas condições deste Estado.

Balardin et al. (1997) observaram que a antracnose tem se mostrado endêmica e severa em percentuais maiores na América central e América do sul, locais onde o patógeno tem apresentado maior variabilidade genética. No Brasil, foram realizados inúmeros trabalhos na tentativa de elucidar a variabilidade existente na população deste patógeno, (ALZATE MARIN; SARTORATO, 2004; SILVA, 2004; TALAMINI, 2004). Silva (2004), utilizando cultivares diferenciadoras e marcadores RAPD, estudou a variabilidade patogênica de isolados de diferentes regiões, observando uma maior variabilidade intra-raça quando o DNA analisado foi o genômico e de isolados da raça 65 coletados no estado de Minas Gerais. Neste mesmo levantamento, a raça 65, seguida das raças 81 e 73 foram as mais freqüentes.

Talamini et al. (2004) identificaram 11 raças a partir de 43 isolados provenientes de lavouras das principais regiões produtoras de feijão do Brasil. Neste trabalho, foram encontradas por ordem decrescente de freqüência, as raças: 65, 81, 337, 87, 73, 64, 0, 593, 83, 89 e 8, sendo observada maior freqüência de raças pertencentes ao grupo alfa (55, 81 e 337). Os autores concluíram que raças pertencentes a este grupo predominaram nas lavouras avaliadas.

Mahuku; Riascos (2004) realizaram levantamento em vários países, identificando 90 raças entre os 200 isolados amostrados. Foram identificadas as raças 3481, 3545, 3977 e 3993. Neste levantamento todas as cultivares diferenciadoras, inclusive a G2333, foram suscetíveis aos isolados de *C. lindemuthianum*. A utilização do conjunto diferenciador composto das 12 cultivares definido por Pastor-Corrales (1989) já não é suficientemente discriminatório para a população deste patógeno (SILVA, 2004).

Balardin (1997) ao estudar isolados provenientes das Américas do Norte, Central e Sul, observou que a frequência de isolados cosmopolitas foi muito reduzida em relação aos isolados clonais, onde a pressão de seleção devido ao lançamento de variedades novas exerceu uma pressão local e suficiente para que a frequência destes isolados fosse significativa.

Sabe-se que no caso da resistência de fungos a fungicidas, mutação associada à seleção constitui os dois principais mecanismos genéticos responsáveis por alterações no perfil da população de um fungo, e que podem acarretar o surgimento de mutantes tolerantes (*mut^t*). Teoricamente, pode ser observada uma proporção de 1 em 10^4 até 1 em 10^9 na taxa de mutabilidade de um patógeno (BURDON; JAROSZ, 1991).

É possível que a incorporação de novos alelos possa afetar o *fitness* (adaptabilidade) da população do patógeno devido à remoção de caracteres quantitativos relacionados à sua sobrevivência, crescimento ou reprodução. Deste modo, mutantes tolerantes (*mut^t*), para predominarem na população, devem apresentar um *fitness* superior ao observado na população selvagem (BURDON; JAROSZ, 1991; BURDON; THOMPSON, 1995).

A adaptabilidade de um alelo mutante depende, fundamentalmente, do gene ou genes que sofreram mutação para resistência. Ocorre que o nível de adaptabilidade dos mutantes não implica variação na probabilidade de resistência dos organismos aos fungicidas, observado no campo. O surgimento de problemas de resistência depende, em grande parte, da pressão de seleção exercida pela inadequada aplicação de fungicidas. Reduções de dose, utilização continuada de poucos ingredientes ativos em áreas extensas, ou inadequada cobertura do dossel das plantas, são possíveis causas do surgimento de isolados mutante. O conhecimento do comportamento de cada grupo químico é fundamental para o estabelecimento de estratégias anti-resistência, uma vez que cada um deles

caracteriza-se por um modelo típico de desenvolvimento de resistência. (FORCELINI et al., 2001). Assim posto, é importante o monitoramento da população de patógenos, para que se possa determinar o nível de risco das raças com maior frequência de ocorrência apresentar uma variação significativa na sensibilidade de aos fungicidas.

2.1.3 Resistência de fungos a fungicidas

A resistência a fungicidas é definida como uma alteração herdável e estável em um fungo em resposta à aplicação continuada de um fungicida, resultando numa redução da sensibilidade ao produto (EUROPEAN, 1988; BRENT, 1995). Resulta de uma ou mais alterações na constituição genética da população de um patógeno, existindo evidências relevantes de que alelos mutantes sejam constitutivos, embora em frequência irrelevante. Outro conceito utilizado é a tolerância a fungicidas, que segundo European (1988), apesar de muitas vezes ser usado como sinônimo, possui significado ambíguo já que nem sempre envolve alterações genéticas e, segundo ele não deve ser usado no caso de resistência a fungicidas.

Neste sentido, a perda de sensibilidade na população de alguns fungos nada mais é do que um acréscimo na frequência dos isolados tolerantes devido à necessidade de aumento de *fitness*. Conforme Ghini; Kimati (2000), mutação e seleção são as forças genéticas que melhor explicam o surgimento de isolados com sensibilidade alterada.

O aumento da frequência de uso de um mesmo fungicida ou fungicidas de um mesmo grupo químico e particularmente significativo no caso de patógenos que produzem uma grande quantidade de esporos, e apresentam um curto período entre gerações. Para Brent (1995), esta teoria representa a forma mais simples de resistência, e pode ser denominada de teoria do “gene maior” sendo este o padrão característico de fungicidas benzimidazóis, fenilamidas e dicarboximidas.

O risco de resistência está intimamente relacionado com o grupo químico a que pertence o fungicida, mais especificamente ao seu mecanismo de ação, sendo que cada um deles, possui um modelo típico de desenvolvimento de resistência.

Com o advento dos fungicidas sistêmicos, ocorreram grandes mudanças nos programas de controle químico das doenças, sendo que os primeiros lançados no

mercado foram os Benzimidazóis e carboxamidas na década de 1960. Esses fungicidas são obrigatoriamente seletivos, atuando em um ou poucos processos metabólicos do fungo, não podendo ser fitotóxicos às culturas submetidas aos produtos, pois são absorvidos nos tecidos, agindo preventiva e/ou curativamente. Segundo Sierostki; Gisi (2000), os fungicidas sistêmicos apresentam como características: fungitoxicidade direta; baixa solubilidade; penetração nos tecidos aéreos e raízes passando para o xilema; movimento ascendente pela corrente transpiratória, acumulando-se nas margens das folhas; incapacidade de chegar aos órgãos que não transpiram; pequena translocação descendente via floema e um variado espectro de ação. Foi a partir da utilização intensa dos fungicidas sistêmicos para o controle de doenças, que se iniciaram os problemas de resistência de fungos aos fungicidas. De acordo com KIMATI (1987), a seletividade, que possibilita um fungicida atuar sistemicamente, aumentando sua eficiência, é também a causa principal da sua vulnerabilidade. O principal motivo para o elevado risco de resistência destes fungicidas se dá devido à toxicidade para um único sítio de ação do fungo, sendo que, uma única alteração neste, pode resultar em resistência ao fungicida (EDGINGTON et al., 1980; BRENT, 1995).

Os fungicidas pertencentes a um mesmo grupo químico apresentam a chamada resistência cruzada, caracterizada como, populações de patógenos que desenvolvem resistência a um fungicida, simultaneamente desenvolvem resistência a outros fungicidas que sofrem mutação gênica semelhante, possivelmente por possuírem o mesmo mecanismo de resistência. Por exemplo, entre os benzimidazóis, carbendazin e tiofanato metílico, são comuns a ocorrência de resistência cruzada. Para as estrobilurinas, isto pode ocorrer para azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina (SIEROSTKI; GISI, 2000).

Sabe-se que o conhecimento do mecanismo de ação dos fungicidas pode oferecer várias informações sobre o risco de desenvolvimento de resistência, pois desta forma, é possível relacionar a sua ação nos diversos processos metabólicos dos fungos com os mecanismos de resistência já conhecidos até o momento. Nas últimas décadas, diversos estudos foram realizados com o objetivo de elucidar estes mecanismos. Até o momento existe uma boa compreensão dos mecanismos mais importantes de resistência aos fungicidas benzimidazóis, difenilamidas, carboxanilidas e fosforotiolatos. Entretanto, BRENT (1995), alerta para a dificuldade de entendimento e de informações sobre os fungicidas DMI (Inibidores da

demetilação), alertando para a existência de evidências de que a mutação de genes distintos pode ativar um número diferente de mecanismos de resistência, não relacionados entre si, e que podem agir simultaneamente e ainda de modo sinérgico.

Os fungicidas DMIs, que se caracterizam por inibir a biossíntese de ergosterol, importante componente da membrana celular dos fungos sensíveis, são caracterizados por atuar primariamente na demetilação do C-14. Os triazóis são os principais fungicidas representantes deste grupo. No caso dos fungicidas benzimidazóis, por exemplo, afetam especificamente a divisão celular, pois apresentam atividade seletiva para a molécula protéica tubulina dos fungos, impedindo que ocorra a polimerização dos microtúbulos formadores do fuso mitótico e conseqüentemente, a mitose (KENDALL et al., 1994; WHEELER et al., 1995). Os fungicidas do grupo das estrobilurinas também agem de maneira específica, apresentando por isso alto risco de resistência, estes fungicidas interferem na respiração mitocondrial, pois bloqueiam a transferência de elétrons pelo complexo citocromo bc1 (SIEROSTKI; GISI, 2000).

Sabe-se que no caso da resistência se tornar um problema prático, caracterizando-se pela perda de eficiência do fungicida no campo, é provável que mutações provoquem alteração no local de ação onde o fungicida atuava na população sensível do fungo. Devido a esta alteração, a ligação do fungicida a este sítio torna-se menos efetiva, ou não ocorre. Para Hollomon (2008) estas alterações ocorrem em genes nucleares, e também, nos genes codificados na mitocôndria, sendo este último o principal mecanismo de resistência das estrobilurinas. O mesmo autor relata que, quando a alteração se dá no gene principal, a recombinação genética entre indivíduos resistentes e não mutantes irá gerar duas classes distintas de indivíduos na progênie, ou seja, uma totalmente resistente e outra, totalmente sensível, não ocorrendo nenhuma com sensibilidade intermediária. É devido a isso que, quando a seleção para resistência se dá no gene principal, geralmente o resultado é um rápido decréscimo da eficiência do produto.

Até o momento, são conhecidas somente as alterações nos aminoácidos das proteínas alvo que causam resistência, no caso dos fungicidas benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas. Sierotski et al. (2000) relatam altos níveis de resistência a estrobilurinas e fungicidas similares (QOIs - anteriormente grupo STAR) em diversos fungos sendo que na análise da seqüência de fragmentos parciais do gene alvo citocromo bc-1 codificado mitocondrialmente mostra que a mutação ocorreu no

ponto G143A. Nesse caso, ocorre uma substituição da base Glicina por uma Alanina ligeiramente maior na região da proteína envolvida na ligação dos fungicidas QOI, e próxima ao centro Qo, entretanto, ainda não existem evidências bioquímicas que confirmem que esta mutação altera a ligação do fungicida.

Existem outros mecanismos, diferentes de alterações no sítio alvo que podem ocasionar problemas de resistência a fungicidas. A desintoxicação metabólica de fungicidas é dificilmente encontrada, possivelmente pelo fato dos fungos não possuírem mecanismos de excreção e capazes de gerar metabólitos possíveis de serem expelidos por vias aquosas. Por outro lado, os fungos possuem um sistema de transporte através de proteínas que tem a função tanto de absorção de nutrientes, como no efluxo de moléculas indesejáveis (HOLLomon, 2008). Contudo, a utilização deste sistema ocasiona um gasto de energia pelo fungo, principalmente quando fungicidas solúveis em lipídios, são expelidos por uma membrana também de lipídio, e ainda, contra o gradiente de concentração. O principal problema ocasionado por este mecanismo de efluxo é o fato de não ser seletivo, podendo gerar resistência cruzada em fungicidas com diferentes mecanismos de ação.

Dessa forma, tendo em vista a importância dos fungicidas em garantir altas produtividades das culturas, dos grandes investimentos feitos por parte do setor privado, agrícola e também da pesquisa, com relação ao problema de resistência de fungos a fungicidas, ressalta-se a importância prática desse trabalho. E devido a esse fato, o monitoramento de populações de importantes patógenos se faz necessário para que possamos compreender as causas das frustrações no controle químico de determinadas doenças a campo, e também tomar conhecimento de quais fatores podem ser manejados no sentido de evitar esse tipo de problema.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Ambos os experimentos foram conduzidos no laboratório de fitopatologia e na casa de Vegetação da Divisão de Pesquisa do Instituto Phytus, localizado no município de Itaara/RS.

3.1 METODOLOGIA GERAL

3.1.1 Origem dos isolados

Os isolados do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* foram obtidos de coleções do Instituto agrônomo de Campinas (IAC), Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (EMBRAPA-CNPAF), Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI) e Instituto Phytus (Tabela 1).

TABELA 1 Identificação e origem dos isolados utilizados. Santa Maria, 2009.

Isolado	Origem	Instituição
CL 837	Buritis/MG	CNPAF/EMBRAPA
CL 1135	Vitória/ES	CNPAF/EMBRAPA
W 25	Ponte Serrada/SC	EPAGRI/SC
W 183	Ponte Serrada/SC	EPAGRI/SC
B 01	Itaara/RS	Instituto Phytus
Raça 65 (9253)	São Paulo	Centro de Fitossanidade / IAC
Raça 08 (LV 14)	Lavras/ MG	Universidade Federal de Lavras
Raça 81 (LV 95)	Lavras/ MG	Universidade Federal de Lavras
Raça 321 (LV 67)	Lavras/ MG	Universidade Federal de Lavras
Raça 337 (LV 88)	Lavras/ MG	Universidade Federal de Lavras

3.1.2 Cultivo dos isolados

Após o recebimento dos isolados, os mesmos foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (20% batata, 2% dextrose, 1,5% ágar) e

mantidos em sala de incubação sob temperatura de 21 ± 2 °C, regime de escuro total e durante um período de aproximadamente 7 a 10 dias. Com a esporulação das colônias de cada isolado, foi realizada repicagem para placas de Petri com meio de Mathur (Mathur, 1950). Esta repicagem teve por objetivo a produção de esporos de cada isolado para o teste de sensibilidade e foi encerrada aos 10 dias ou quando foi possível visualizar abundante produção de acérvulos.

A produção de esporos para a realização dos testes foi feita repicando-se todos os isolados em meio de cultura de mathur (MATHUR, 1950), sendo posteriormente mantidos em câmara de crescimento sob escuro contínuo por aproximadamente 15 dias, período em que foi possível observar abundante produção de esporos do fungo.

3.1.3 Confirmação da reação fisiológica dos isolados

Adotou-se como critério, inocular as raças 8, 65, 81, 89, 321 e 337 na série diferenciadora (CIAT, 1990) para confirmação das raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. Os isolados W 25, W 183, CL 1135, CL 844 e B 01 foram inoculados em plantas de feijão (cultivar FT- Nobre) com o objetivo de restabelecer a virulência destes isolados. Toda essa etapa foi realizada em casa de vegetação com condições de temperatura e umidade parcialmente controladas (temperatura em torno de 20°C e umidade relativa acima de 90 %), sendo realizada a inoculação de um isolado por vez, evitando assim, possíveis contaminações entre os mesmos. Após o aparecimento de sintomas, as plantas eram coletadas e levadas ao laboratório para posterior reisolamento.

3.1.4 Manutenção de isolados originais

Os isolados originais foram mantidos em geladeira sob temperatura de 4 ± 1 °C, sendo utilizados como matrizes para a realização dos experimentos.

3.1.5 Avaliação *in vitro*

3.1.5.1 Porcentagem de germinação

Foi determinada a partir da contagem de 50 esporos em cada placa de Petri em uma região onde a distribuição dos esporos fosse normal e não influenciada por fatores alheios aos objetivos do experimento. A contagem foi realizada em microscópio óptico marca Quimis em aumento de 40 X.

O critério para considerar o esporo germinado obedeceu à descrição de Ulloa; Hanlin (2000), que descreve o tubo germinativo como uma hifa curta que cresce a partir do poro germinativo durante a germinação e que tem desenvolvimento contínuo sob condições favoráveis, formando uma hifa de maior comprimento (micélio), sendo também considerada como uma nova fase assimilativa do fungo. Do ponto de vista deste experimento, foi considerado o tubo germinativo completo quando seu comprimento foi superior a maior largura do esporo.

3.1.6 Avaliação *in vivo*

Os isolados inoculados foram previamente cultivados em meio de cultura mathur por aproximadamente 14 dias com o objetivo de produzir esporos do fungo. As placas foram incubadas em sala termo - climatizada com temperatura de $21 \pm ^\circ\text{C}$, em escuro completo até abundante esporulação. Para o preparo das suspensão do inóculo, eram adicionadas as placas uma quantidade aproximada de 20 mL de água destilada. Após era realizada uma raspagem com auxílio de uma alça de drigalski com objetivo de liberar os esporos do meio de cultura. A concentração de esporos foi ajustada para 1×10^6 esporos /mL com o auxílio da câmara de Neubauer.

Anteriormente a realização do teste os isolados foram inoculados na cultivar de feijão FT-Nobre para que todos estivessem em um mesmo patamar de virulência.

O início das avaliações ocorreu entre 7 e 8 dias após a inoculação e realizadas de 3 em 3 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas através da contagem de lesões em todas as folhas.

Os dados de contagem de lesões foram utilizados para determinar a dose letal capaz de diminuir em 50% o número de lesões com relação à testemunha sem fungicida. A partir da análise destes dados, foi possível calcular a DE_{50} com o auxílio do software R e Tim R, e com os valores obtidos, classificar cada isolado com relação à sensibilidade frente aos fungicidas testados, utilizando a escala adaptada de Edgington et al. (1971).

A unidade experimental foi representada por um recipiente plástico contendo uma planta de feijão em estágio V_2 (primeiro par de folhas expandidas), com três repetições em delineamento inteiramente casualizado.

3.1.7 Estatística: delineamento e análise

A parcela experimental foi constituída por uma placa de Petri e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições.

Os dados obtidos (porcentagem de germinação e número de lesões) foram utilizados para o cálculo da DL_{50} para cada fungicida. As médias de cada tratamento foram submetidas à análise no software R e Tim R, obtendo-se os valores de DL_{50} – dosagem necessária para inibir 50% da germinação de conídios ou ainda 50% do aparecimento de lesões. Após o cálculo da DL_{50} , os fungicidas foram classificados em quatro categorias, de acordo com a escala adaptada de Edgington et al. (1971), onde: insensíveis se a $DL_{50} > 50$ ppm; moderadamente sensíveis se a DE_{50} estiver entre 1 e 10 ppm; altamente sensíveis se a $DE_{50} < 1$ ppm.

3.2 METODOLOGIA ESPECÍFICA

3.2.1 EXPERIMENTO 1: Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas

- a) **Fungicidas:** no experimento 1 foram utilizados produtos pertencentes ao grupo dos benzimidazóis (carbendazin e tiofanato metílico) e ao grupo das estrubilurinas (azoxistrobina e piraclostrobinas).

- b) **Preparo de soluções:** os fungicidas foram inicialmente diluídos em água destilada estéril para obtenção de uma solução com concentração inicial de 1000 ppm (solução base). Soluções estoques de 100, 10 e 1 ppm foram preparadas a partir da solução base, das quais foram geradas as soluções experimentais (0, 0,1, 1,0, 10 e 100 ppm). A concentração experimental final foi calculada considerando uma quantidade final de 10 mL de meio acrescido de volume necessário do fungicida para que a concentração experimental correspondente fosse atingida.
- c) **Aplicação dos fungicidas:** a solução fungicida foi adicionada ao meio de cultura Agar – água (1,5% ágar) com auxílio de uma pipeta automática, sendo homogeneizada e vertida em placas de Petri (3,5 cm de diâmetro). A temperatura do meio de cultura por ocasião da adição da solução experimental de cada fungicida foi de 45 ± 5 °C.
- d) **Suspensão de esporos:** foram preparadas com 10 ml de água destilada estéril vertida na placa de Petri contendo os esporos. A concentração de 10000 esporos/mL foi obtida a partir de diluições sucessivas e contagens em câmara de Neubauer.
- e) **Inoculação:** em cada placa foi depositada uma quantidade de 50 μ L desta suspensão correspondendo a uma concentração final de 500 esporos/mL. A suspensão de esporos foi espalhada com o auxílio de alça de Drigalski.

As placas de Petri (3,5 cm de diâmetro) foram mantidas em sala de incubação, a uma temperatura de aproximadamente 21 ± 2 °C em escuro completo por 36 horas. Este período foi determinado a partir de testes preliminares que apontaram para um tempo ideal de 36 horas para que os esporos apresentassem germinação ideal. Ao final deste período foi determinada a germinação dos esporos (item 2.1.5) e os dados analisados (item 2.1.7).

3.2.2 EXPERIMENTO 2: Sensibilidade *in vivo* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*

- a) **Fungicidas:** foi avaliada a sensibilidade dos diferentes isolados aos fungicidas do grupo dos triazóis (tebuconazole e epoxiconazole).
- b) **Preparo de soluções:** foram utilizadas cinco concentrações de ingrediente ativo. Os fungicidas foram inicialmente diluídos em água destilada estéril para obtenção de uma solução com concentração inicial de 1000 ppm (solução base). Soluções estoques de 100, 10 e 1 ppm foram preparadas a partir da solução base, das quais foram geradas as soluções experimentais (0; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 50,0 ppm) (Tabela 2).
- c) **Aplicação dos fungicidas:** os tratamentos foram aplicados pelo método de imersão das folhas na solução fungicida por aproximadamente cinco segundos, sendo que anteriormente estas folhas foram submersas em uma solução do espalhante adesivo Tween 80 (solução a 10%), com o objetivo de facilitar a posterior adesão da calda fungicida, e também da suspensão de esporos do fungo às folhas.
- d) **Suspensão de esporos:** após 24 horas da aplicação dos fungicidas nas folhas, os isolados foram inoculados. Suspensões de esporos de cada isolado foram preparadas a partir de placas com abundante esporulação do patógeno e previamente cultivadas em meio de Mathur (MATHUR, 1950). Foi utilizada uma concentração padrão de esporos ($1,2 \times 10^4$ esporos.mL⁻¹) em todas as inoculações.
- e) **Inoculação:** foram utilizadas folhas de feijão (cultivar Uirapuru suscetível à antracnose) em estágio V₂ obtidas de plantas produzidas em câmara de crescimento com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 16h/12h (luz/escuro), e em condições totalmente livres de inóculo. As plantas de feijão foram produzidas em bandejas plásticas de polipropileno (30 x 18 cm) contendo substrato estéril Plantmax®.

As plantas de feijão foram cortadas a 10 cm abaixo da altura dos cotilédones e imediatamente colocadas em germ-box de polietileno transparente (14 x 11 cm), sobre uma espuma fenólica para dar sustentação à folha evitando o contato direto desta com a água, ficando submersa somente a porção do caule visando o enraizamento.

Foi utilizado um microaspersor da marca Air-brush, acoplado a uma bomba de vácuo invertida para a inoculação. Depois de inoculados, os germ-box com as folhas com os fungicidas e inoculadas com os diferentes isolados, foram mantidas em escuro completo por 24 horas, e após, colocadas em câmara de incubação com temperatura 21 ± 1 °C e fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro).

4 EXPERIMENTO 1: Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças na sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* com relação aos fungicidas testados.

Os dados referentes à porcentagem média de germinação de conídios de *C. lindemuthianum* em diferentes concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina são apresentados a seguir:

TABELA 2 Fungicidas dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação do isolado CL 837. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	0,6521	0,2919	AS ¹
benzimidazol	tiofanato metílico	0,4035	0,1375	AS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0049	0,0065	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,0167	0,0092	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível

TABELA 3 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação do isolado CL 1135. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	0,1121	0,0191	AS ¹
benzimidazol	tiofanato metílico	0,3415	0,0399	AS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0177	0,0043	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,0191	0,0062	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível

TABELA 4 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação da raça 08. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	5,7657	1,7233	MS ¹
benzimidazol	tiofanato metílico	6,1756	1,1744	MS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0458	0,0059	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,0004	0,0045	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I- insensível

TABELA 5 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação da raça 65. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	5,6693	0,7660	MS
benzimidazol	tiofanato metílico	0,2999	0,0473	AS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0189	0,0023	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,4070	0,0612	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível.

TABELA 6 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação da raça 81. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	14,0970	5,8980	BS
benzimidazol	tiofanato metílico	0,8204	0,1805	AS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0131	0,0082	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,0350	0,0145	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível.

TABELA 7 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação da raça 321. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	1,1598	0,1912	MS
benzimidazol	tiofanato metílico	0,4035	0,1375	AS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0038	0,0047	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,0485	0,0133	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I insensível

TABELA 8 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação da raça 337. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	0,8377	0,3775	AS
benzimidazol	tiofanato metílico	3,0810	0,5185	MS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0290	0,0093	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,1579	0,0416	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível

TABELA 9 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação do isolado W 25. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	0,0615	0,0310	AS ¹
benzimidazol	tiofanato metílico	0,8496	0,1644	AS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0349	0,0071	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,0617	0,0116	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível

TABELA 10 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação do isolado W 183. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	0,0725	0,0179	AS ¹
benzimidazol	tiofanato metílico	0,3653	0,0317	AS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0262	0,0061	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,0248	0,0059	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível

TABELA 11 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, e classificação do isolado B 01. Santa Maria, 2009.

Grupo químico	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação
benzimidazol	carbendazin	0,0928	0,0261	AS ¹
benzimidazol	tiofanato metílico	0,0237	0,0103	AS
estrobilurina	azoxistrobina	0,0011	0,0009	AS
estrobilurina	piraclostrobina	0,0010	0,0008	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível

De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que dos 10 isolados testados, entre CL 837 (figura 6), CL 1135 (figura 7), W 25 (figura 8), W 183

(figura 9) e B 01 (figura 10), não houve variação de sensibilidade frente aos quatro fungicidas utilizados, apesar destes, terem apresentado valores bem distintos de DE_{50} , sendo encontrados valores entre 0,0010 ppm (tabela 11) para o isolado B 01, até 0,8496 ppm (tabela 9) para o isolado W 25., entretanto, este grupo de isolados foi classificado de acordo com a escala adaptada de Edgington et al. (1971) como altamente sensíveis.

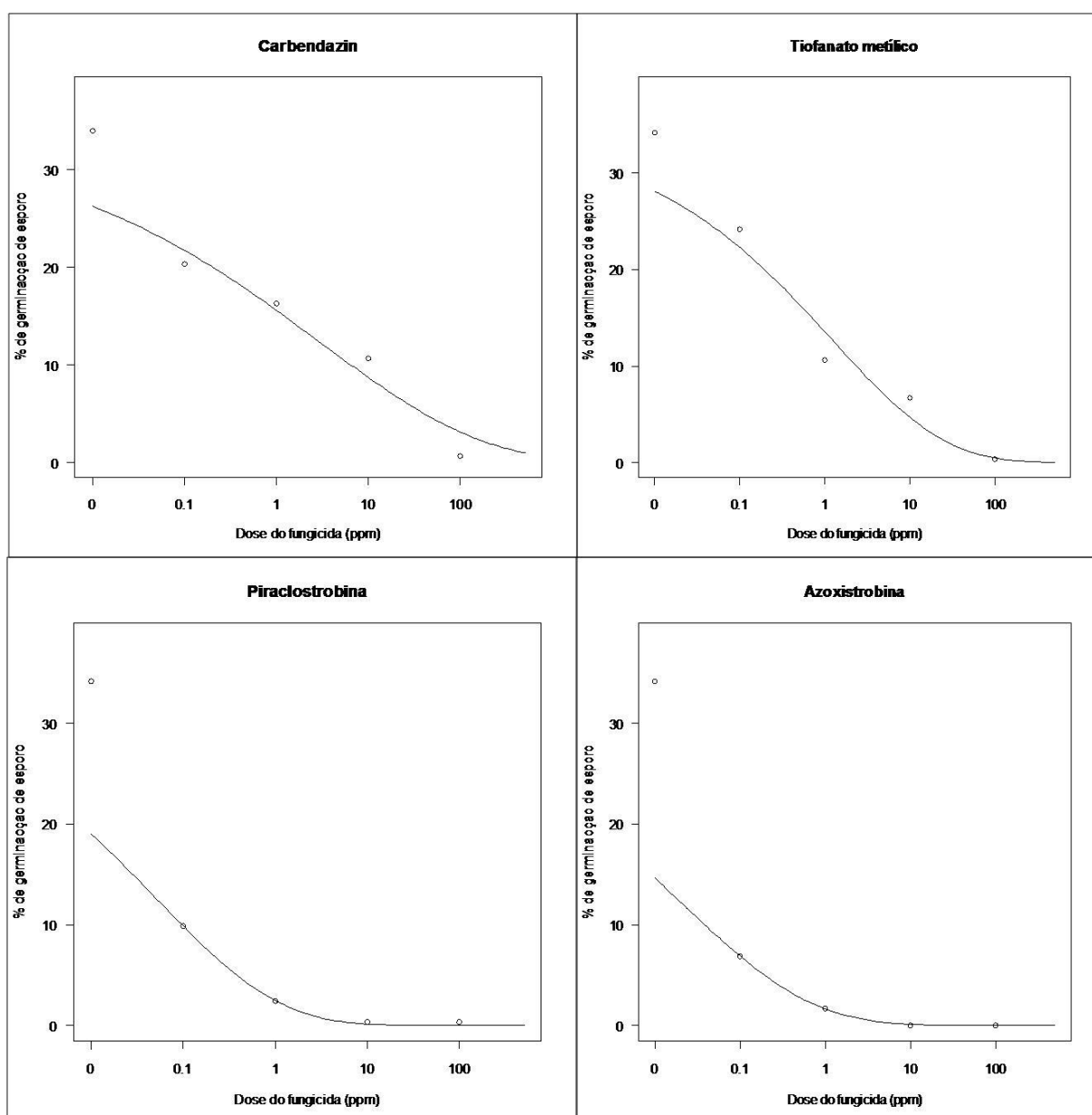


Figura 1 Porcentagem de germinação de conídios do isolado CL 837 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

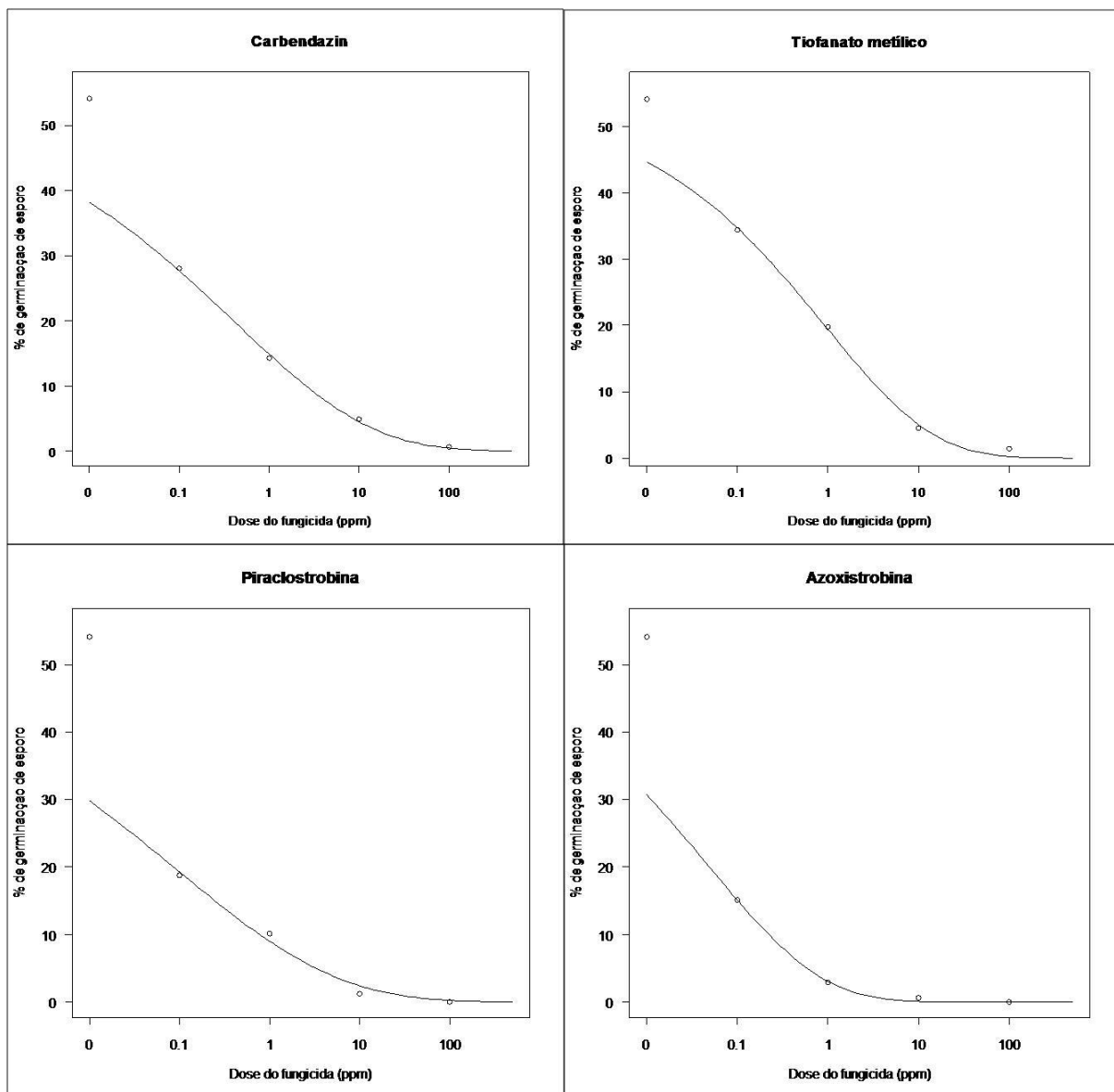


Figura 2 Porcentagem de germinação de conídios do isolado CL 1135 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

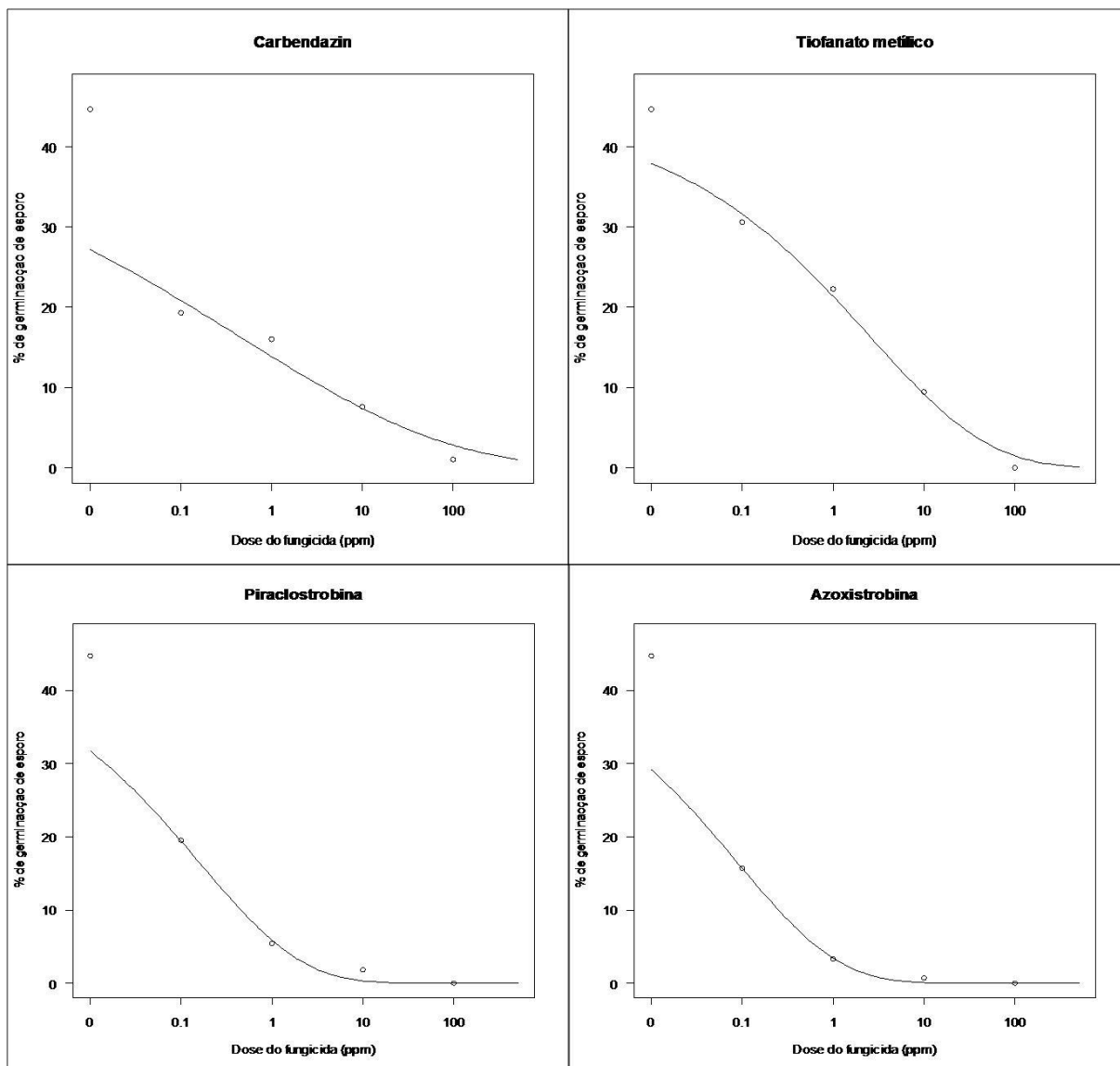


Figura 3 Porcentagem de germinação de conídios do isolado W 25 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

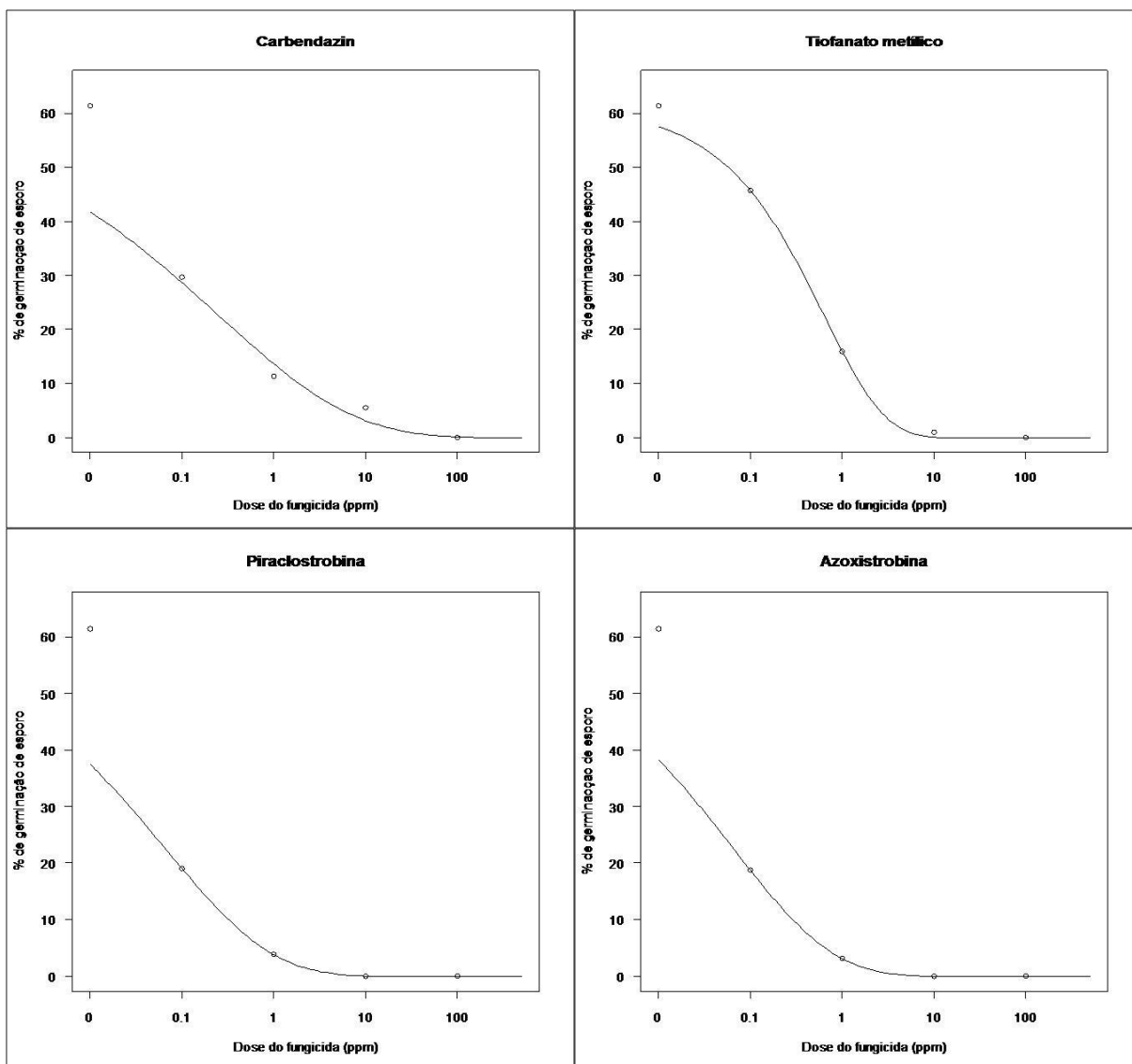


Figura 4 Porcentagem de germinação de conídios do isolado W 183 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

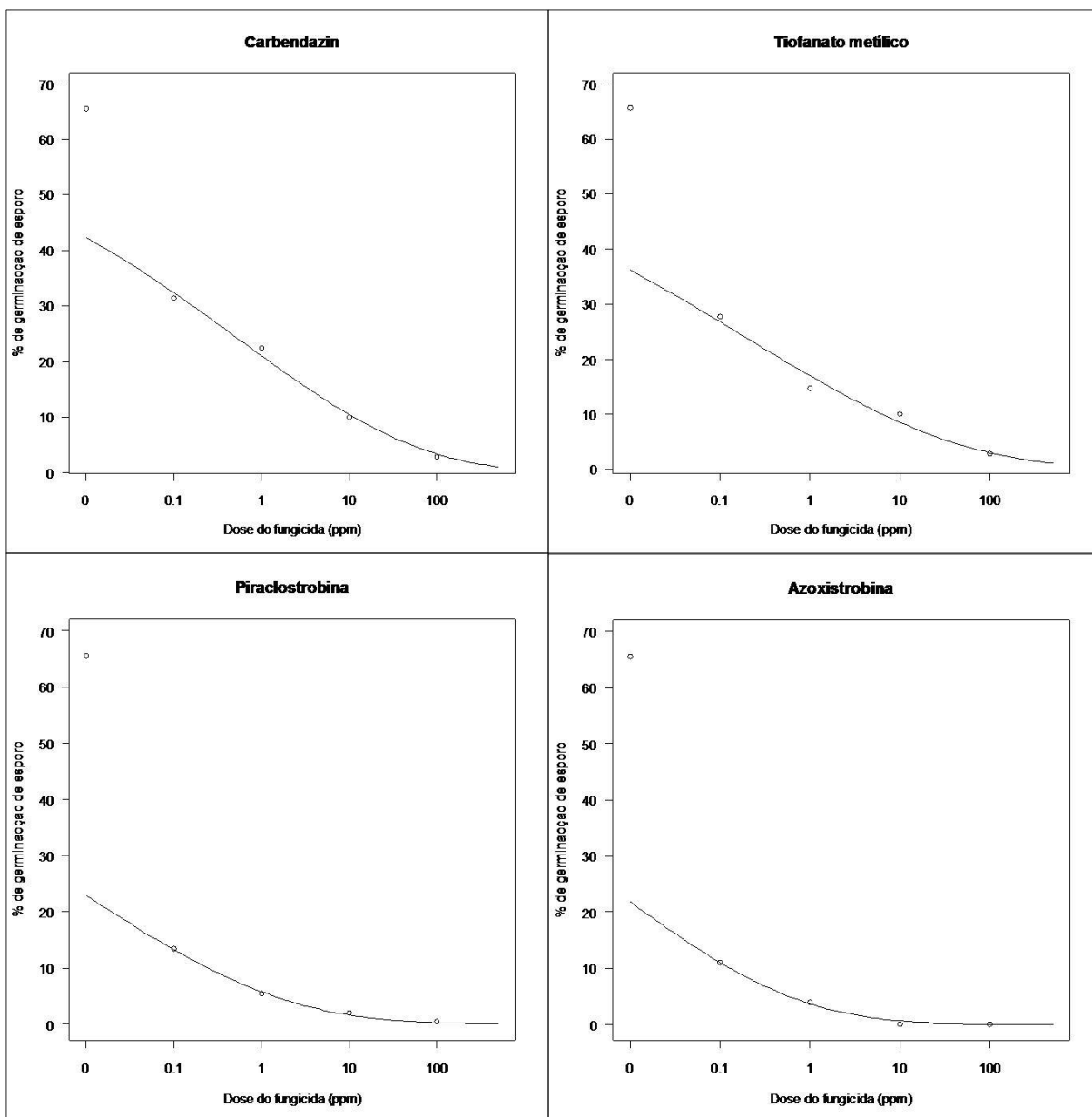


Figura 5 Porcentagem de germinação de conídios do isolado B 01 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

De acordo com Sharvelle (1961) a DL_{50} corresponde à dose letal capaz de inibir 50 % dos esporos viáveis de um fungo, e juntamente com a DE_{95} , é usado para descrever a potência de um fungicida. Para Hassal (1990) a DL_{50} é um índice mais sensível de toxicidade que outro tipo de dose, sendo usualmente adotada como um padrão de comparação da toxicidade de uma substância.

Resultados semelhantes foram obtidos por Tu; Jarvis (1979) testando fungicidas do grupo dos benzimidazóis sobre a germinação de esporos de alguns isolados da raça Delta de *Colletotrichum lindemuthianum*, onde constataram redução da germinação e sobrevivência de esporos do fungo. Entretanto, cabe ressaltar que no final da década de setenta, aproximadamente dez anos após o surgimento dos fungicidas sistêmicos benzimidazóis, possivelmente as populações de *C. lindemuthianum* mostravam-se mais sensíveis a estes fungicidas, se comparadas com a situação atual. Balardin; Rodrigues (1995) avaliaram o crescimento micelial *in vitro* de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, utilizando os fungicidas tiofanato metílico + chlorothalonil, chlorothalonil, trifenil hidróxido de estanho, tiofanato metílico e benomyl, e observaram que o maior efeito inibidor foi causado por benomyl.

Com relação às estrobilurinas, da mesma forma, não houve variação de sensibilidade, sendo os cinco isolados classificados de acordo com os valores de DL_{50} como altamente sensíveis. Os fungicidas desse grupo agem na respiração mitocondrial dos fungos, e por isso são conhecidos pelo seu eficiente efeito preventivo, uma vez que , afetam diretamente a germinação de esporos, impedindo o início da infecção pelo patógeno. De acordo com Anesiadis et al. (2003), as estrobilurinas agem na superfície da folha, inibindo os primeiros estádios do processo de infecção, como a germinação de esporos, penetração e estabelecimento inicial do patógeno. É devido ao seu mecanismo de ação e características que a metodologia mais adequada para avaliar a sensibilidade de fungos a esses fungicidas, é o teste de germinação de esporos em ágar incorporado ao fungicida.

A classificação de sensibilidade encontrada no presente trabalho para os cinco isolados citados acima, quando submetidos às estrobilurinas mostram variação acentuada com relação aos valores de DL_{50} , mas não com relação à classificação entre os grupos químicos e fungicidas, concordando com os resultados obtidos por Sartorato (2006), onde o princípio ativo piraclostrobina apresentou controle completo do crescimento micelial de todos os isolados de *C. lindemuthianum* .Já no caso do fungo *Botrytis cinerea*, agente causal de doenças em vários hospedeiros, Kimura et al. (2001) avaliou a sensibilidade desse patógeno a diversos fungicidas , sendo observada baixa sensibilidade ao fungicida azoxistrobina.tanto para crescimento micelial quanto para germinação de conídios.

É necessário salientar que diferentes mecanismos biológicos estão envolvidos, com relação às respostas em testes de sensibilidade a fungicidas.

Aqueles que avaliam efeito fungistático dos produtos (crescimento de colônia) agem no desenvolvimento do haustório e micélio, e no caso daqueles que avaliam efeito esporocida (germinação de esporos) a interferência ocorrerá durante a formação do tubo germinativo e do apressório. Devido a estas diferenças, muitas vezes ocorrem variações de sensibilidade, mesmo quando considerados isolados de um mesmo local, mesmos fungicidas, mas que foram testados utilizando diferentes metodologias. Pode-se citar como exemplo um trabalho realizado por Reuveni; Sheglov (2002), onde mesmo dentro do grupo das estrobilurinas, o efeito sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Alternaria alternata* variou, apresentando pouca sensibilidade a azoxistrobina, mas alta sensibilidade a trifloxistrobina.

Em trabalho realizado por Stolte (2006), onde foi avaliada a sensibilidade micelial de *Drechslera tritici repentis* a fungicidas triazóis e estrobilurinas, foi observado um valor de DE_{50} inferior a 1,0 ppm (altamente sensível) para o fungicida azoxistrobina para ao isolado 1, semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho. Nesse mesmo trabalho, DL_{50} acima de 50 ppm (insensível) foi encontrada para o isolado considerado suspeito, demonstrando que a pressão de seleção exercida pelo contínuo uso do fungicida azoxistrobina, ou outro do grupo químico das estrobilurinas, no controle de doenças na cultura do trigo pode ter levado a uma alteração na sensibilidade dessa população do fungo a esse grupo de fungicidas. Rodrigues et al. (2007) discute que no caso das estrobilurinas, pode ocorrer resistência cruzada para azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina, sendo essa uma importante informação no manejo integrado de doenças que contemple estratégias anti – resistência aos fungicidas.

O fato desse primeiro grupo de isolados ter apresentado alta sensibilidade aos quatro fungicidas testados, pode sugerir que não houve uma pressão suficiente causada pelo uso intensivo desses fungicidas ao longo dos anos, possivelmente pelo fato desses isolados apresentarem uma reduzida frequência com relação aos demais testados. Balardin; Rodrigues (1995), em trabalho semelhante, constataram a formação de grupos de sensibilidade frente aos princípios ativos testados, concordando com o verificado no presente trabalho. O grupo 3 formado pelas raças lambda e zeta, apresentou crescimento micelial nulo, já na concentração de 12,5 ppm, sendo considerado pelos autores como o grupo mais sensível, pelo fato de apresentarem distribuição mais localizada e serem patogênicas a poucas variedades

de feijão. Os autores concluíram que a probabilidade de aparecimento de isolados adaptados vai depender da frequência das raças fisiológicas, bem como dos fungicidas utilizados.

Mesmo desconhecendo quais raças caracterizam o grupo de isolados em questão, é possível relacionar esta alta sensibilidade encontrada, com a frequência desses isolados nas regiões de cultivo do feijão de onde procederam aos mesmos.

Com relação às raças 321, 337, 08, 65 e 81, foram observadas variações de sensibilidade entre fungicidas e os grupos químicos. Nesse caso, para o fungicida carbendazin foram encontradas as seguintes classificações de sensibilidade: BS (tabela 6), MS (tabelas 4, 5, 7) e AS (tabelas 5, 6, 7 e 8). Já para tiofanato metílico foi obtido MS (tabelas 4 e 8) e AS (tabelas 5, 6 e 7). Mesmo não havendo diferença de classificação quanto à sensibilidade para as estrobilurinas, observaram-se acentuadas diferenças de DE_{50} entre as 5 raças.

A baixa sensibilidade da raça 65 ao fungicida carbendazin, moderada sensibilidade das raças 08, 81 e 321 também a carbendazin e a moderada sensibilidade da raça 337 ao tiofanato metílico, pode estar relacionada à sua ocorrência e alta frequência nas principais regiões produtoras de feijão, que pode ser comprovado através dos levantamentos realizados (BALARDIN; KELLY, 1997; SOMAVILLA; PRESTES, 1999; TALAMINI, 2004) e principalmente nas regiões produtoras dos estados de Minas Gerais e São Paulo, de onde foi proveniente esse grupo de isolados.

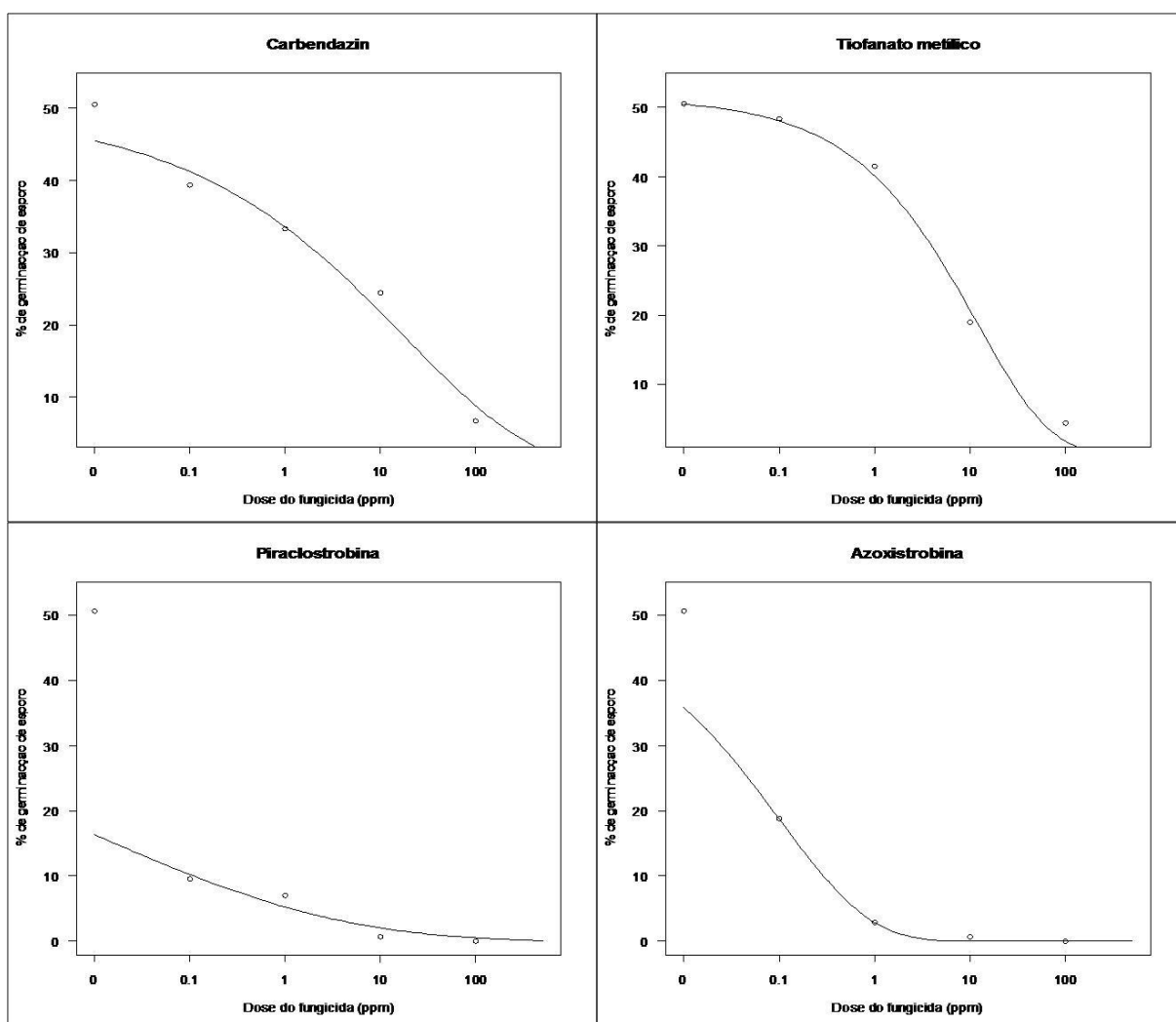


Figura 6 Porcentagem de germinação de conídios da raça 08 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

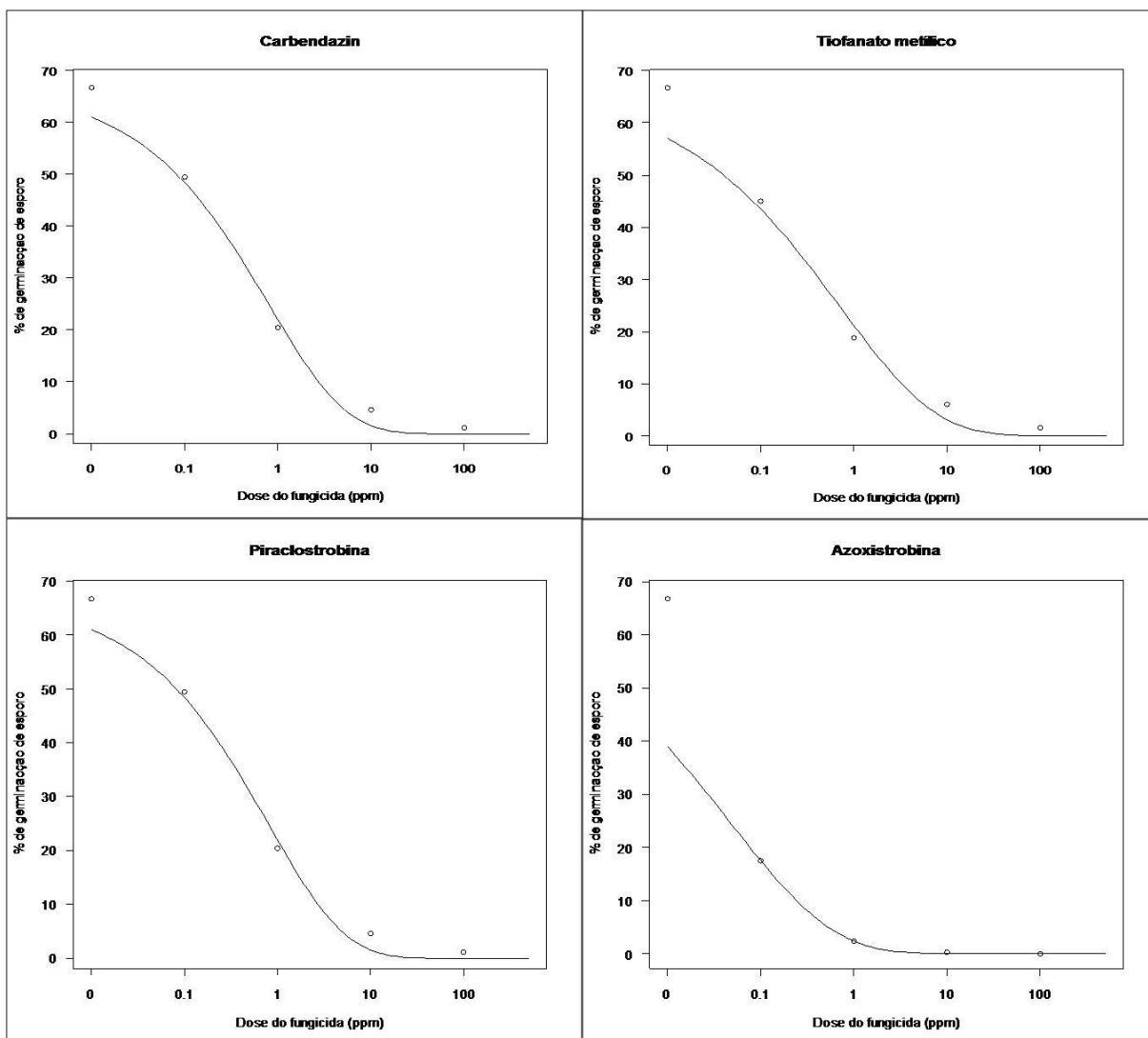


Figura 7 Porcentagem de germinação de conídios da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

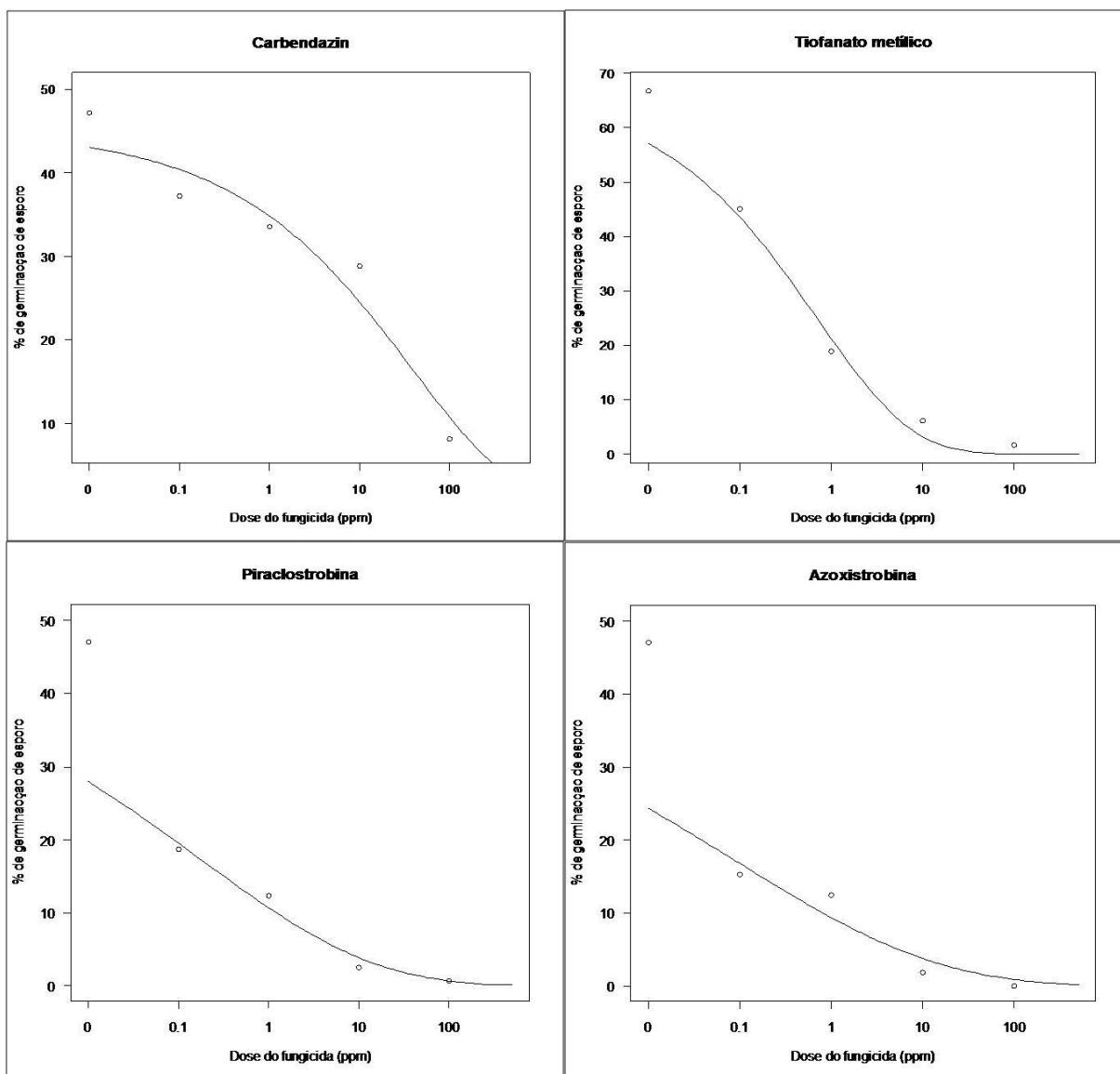


Figura 8 Porcentagem de germinação de conídios da raça 81 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

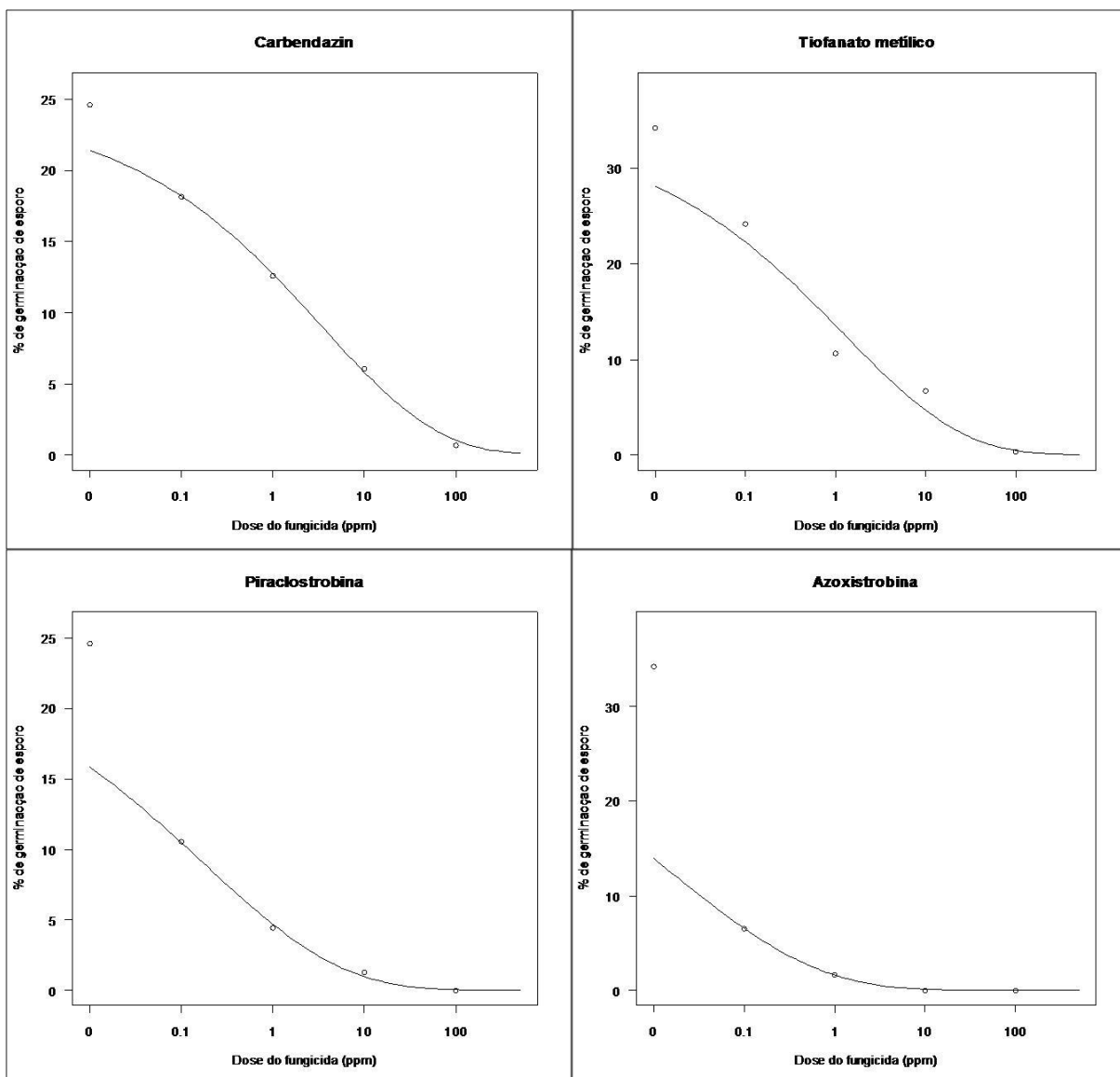


Figura 9 Porcentagem de germinação de conídios da raça 321 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

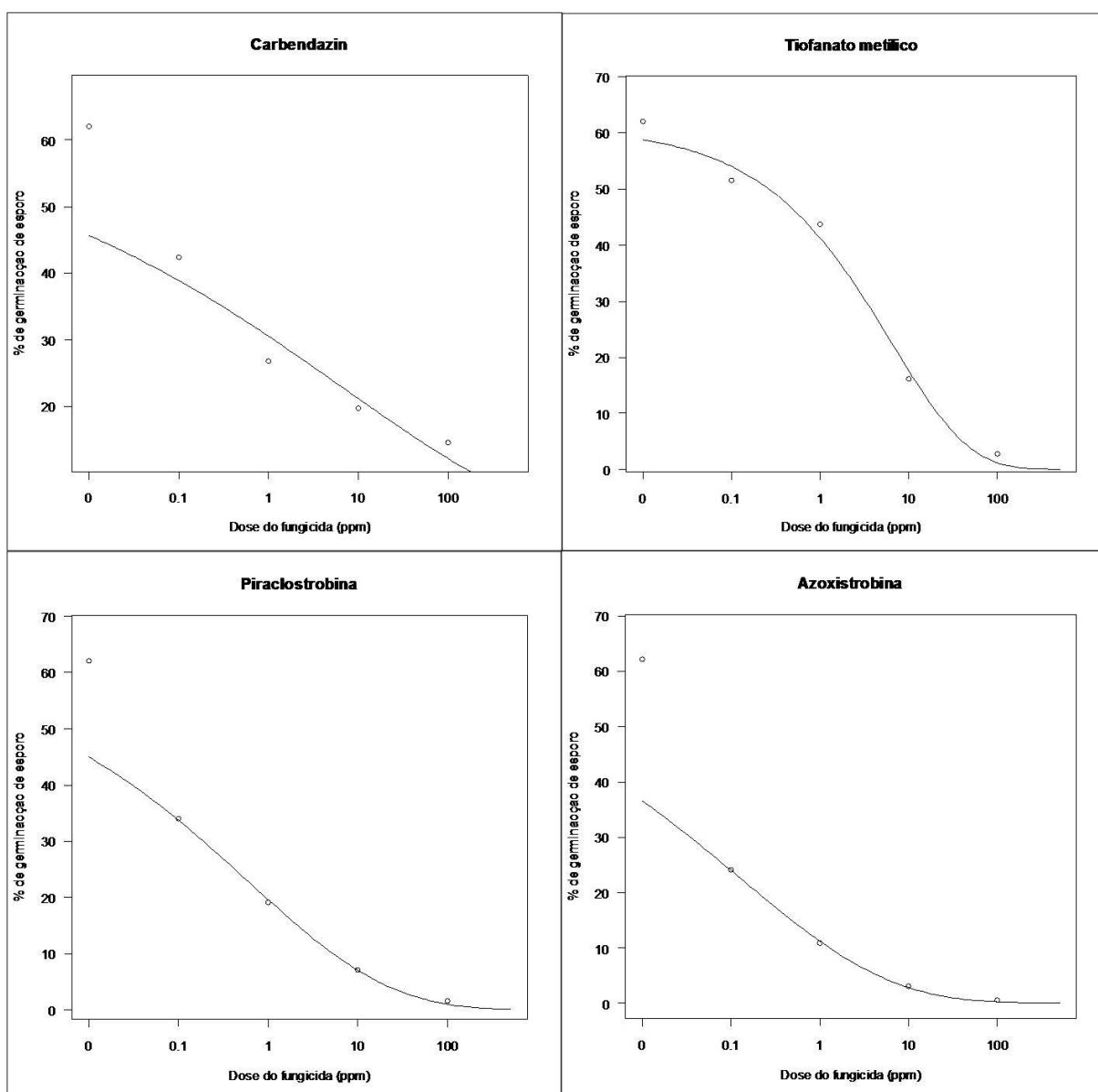


Figura 10 Porcentagem de germinação de conídios da raça 337 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sob quatro concentrações dos fungicidas carbendazin, tiofanato metílico, azoxistrobina e piraclostrobina.

A baixa sensibilidade de *C. lindemuthianum* a benzimidazóis já havia sido identificada por Tu; Mcnaughton (1979), que identificaram 13 biótipos da raça Delta resistentes a benomyl. Mais recentemente, Sartorato (2006) avaliando a sensibilidade *in vitro* de oito isolados de *C. lindemuthianum* a fungicidas, constatou que apenas os isolados CL 900 (Paranapanema-SP) e CL 1015 (Castro-PR), apresentaram alta sensibilidade ao fungicida tiofanato metílico. Porém, os outros

seis isolados apresentaram crescimento de colônia significativamente maior para o fungicida tiofanato metílico em todas as doses, o que pôde ser reiterado no presente trabalho diante da “moderada sensibilidade” da raça 337 ao mesmo fungicida. Picinini (1994) explica que os fungicidas com base na tiuréia, dependem de sua conversão a um anel benzimidazol (metil benzimidazol carbamato - MBC) para atuarem como fungicidas. Maringoni; Barros (2002) observaram baixa sensibilidade aos fungicidas benomyl, carbendazin e tiofanato metílico entre isolados coletados no estado de São Paulo, fato que confirma a existência de resistência cruzada para o grupo dos benzimidazóis. Essa baixa e moderada sensibilidade conidial a carbendazin encontrada no presente estudo também pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação, que é baseado na sua ligação a β -tubulina, que interfere na divisão durante a metáfase da mitose. A resistência ao carbendazin é causada pela mutação em um único gene, resultando em ligeiras alterações na tubulina que levam a redução na afinidade entre ambos (DAVIDSE; FLACH, 1977; REIS et al., 2001).

Devido à forma como a população de *C. lindemuthianum* encontra-se estruturada, como é possível perceber diante do exposto, é reforçada a hipótese de que as populações em questão provavelmente sofreram alta pressão de seleção em função da aplicação intensa e sucessiva dos mesmos fungicidas ou de produtos com o mesmo mecanismo de ação. Levantamentos realizados por Carbonell et al. (1999), identificaram nove raças de *C. lindemuthianum* no estado de São Paulo, sendo predominantes as raças 65, 81 e 89, que segundo os autores, são de ocorrência freqüente em todo o país. Silva (2004) realizou levantamento de raças do patógeno em vários estados brasileiros, especialmente nas principais regiões produtoras de feijão como Minas Gerais e Paraná. Ele encontrou no estado de Minas Gerais, por ordem decrescente de freqüência as raças 65, 81, 73, 337, 87, 08.

A pressão de seleção exercida pela aplicação de fungicidas é o principal fator responsável pela perda de sensibilidade das populações de fungos, e por isso deve ganhar atenção especial (GHINI; KIMATI, 2000). Essa pressão é diretamente proporcional às doses de fungicidas aplicadas, sendo um grave erro cometido pelos produtores, a utilização de subdoses dos produtos, onde sempre uma pequena parte da população do patógeno não é eliminada.

Sendo *C. lindemuthianum* um patógeno com alta taxa de multiplicação e produção de esporos, maiores são as chances de aumentar essa porção “insensível” da população do patógeno no próximo ciclo da doença. As aplicações posteriores de

fungicidas irão selecionar as células resistentes, eliminando as sensíveis, e fazendo com que o fungicida se torne cada vez menos eficaz.

De acordo com Staub; Sozzi (1984), os dois principais fatores de risco para o desenvolvimento de resistência são a biologia do fungo e a química do fungicida, sendo parâmetros indispensáveis para a estimativa do risco de resistência para determinadas relações fungo/fungicida. Esses dois fatores relacionam-se diretamente ao modo bioquímico de ação, à adaptação da raça resistente, taxa de reprodução do fungo alvo, disseminação dos esporos e a duração da alta pressão de seleção em virtude de condições climáticas.

Com relação ao manejo do fungicida em si, deve-se atentar para fatores como: número de gerações do patógeno que foram expostas ao tratamento, uso contínuo dos mesmos fungicidas, utilização de misturas eficazes de produtos, resistência do hospedeiro e tamanho da população do fungo. Os autores salientam que com relação ao risco devido ao manejo de fungicidas, é possível minimizá-los com a utilização de cultivares resistentes ou práticas culturais que reduzam pressão de doença, quando não podemos controlar os outros dois fatores.

A frequência de aplicação, ao grau de cobertura do dossel, à persistência na cultura ou no solo e ao tamanho da área tratada também devem ser considerados.

Com relação ao grupo das estrobilurinas, ao contrário dos benzimidazóis, não houve diferença quanto à classificação de sensibilidade, sendo todos considerados como altamente sensíveis aos fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina, de acordo com a escala adaptada de Edgington et al. (1971). Sabe-se que a germinação de esporos é um processo que envolve grande gasto de energia, bem como alta taxa respiratória, GISI et al. (2000). Por essa característica, o efeito esporocida desse grupo de fungicidas já foi estudado para outros patógenos (YPEMA; GOLD, 1999; KARADIMOS et al., 2005), sendo confirmado no caso desses isolados de *C. lindemuthianum*.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças de sensibilidade com relação às estrobilurinas, DL₅₀ de 0,0004 ppm foi encontrada para a raça 08 e de 0,4070 ppm para a raça 65, ambas com relação ao fungicida piraclostrobina, evidenciando uma grande variação quanto a sensibilidade entre raças, dentro do mesmo fungicida.

5 EXPERIMENTO 2: Avaliação *in vivo* da sensibilidade de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas triazóis

5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças de DL₅₀ (dose letal capaz de inibir 50 % das lesões do patógeno) entre os isolados com relação aos dois fungicidas testados, entretanto essas diferenças não foram suficientes para discriminar os isolados com relação à escala adaptada de Edgington et al. (1971), com exceção da raça 321, que apresentou moderada sensibilidade ao fungicida epoxiconazole. Os dados referentes ao número de lesões de *Colletotrichum lindemuthianum* quando submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole são mostrados na tabela 12.

TABELA 12 Fungicidas, dose efetiva capaz de inibir 50% do aparecimento de lesões, e classificação dos isolados. Santa Maria, RS. 2009.

Isolado	Ingrediente ativo	DL ₅₀	Erro	Classificação ¹
CL 837	tebuconazole	0,461	0,1750	AS
	epoxiconazole	0,221	0,0557	AS
CL 1135	tebuconazole	0,104	0,0498	AS
	epoxiconazole	0,301	0,0162	AS
raça 08	tebuconazole	0,701	0,0441	AS
	epoxiconazole	0,461	0,1750	AS
raça 65	tebuconazole	0,726	0,1867	AS
	epoxiconazole	0,158	0,0597	AS
raça 81	tebuconazole	0,304	0,1210	AS
	epoxiconazole	0,916	0,1058	AS
raça 321	tebuconazole	0,153	0,0603	AS
	epoxiconazole	1,034	0,0535	MS
raça 337	tebuconazole	0,265	0,0828	AS
	epoxiconazole	0,181	0,0337	AS
W 25	tebuconazole	0,457	0,2179	AS
	epoxiconazole	0,409	0,1205	AS
W 183	tebuconazole	0,324	0,0337	AS
	epoxiconazole	0,328	0,0851	AS
B 01	tebuconazole	0,233	0,0151	AS
	epoxiconazole	0,496	0,0068	AS

¹ AS- alta sensibilidade; MS- moderada sensibilidade; BS- baixa sensibilidade; I-insensível

A alta sensibilidade dos isolados de *C. lindemuthianum* aos fungicidas testados pode ser resultante da não utilização de fungicidas do grupo dos triazóis isoladamente para o controle da antracnose do feijão, isso porque normalmente estes fungicidas são combinados com estrobilurinas, ou ainda com benzimidazóis.

A mistura de fungicidas com diferentes mecanismos de ação é tida como uma estratégia anti-resistência (DEKKER, 1995), sendo que o mais recomendado seria a utilização de um fungicida protetor ou outro com baixo risco de resistência para a mistura com triazóis. Os fungicidas triazóis são conhecidos por atuarem na formação do ergosterol, que é um importante lipídio para a formação da membrana das células dos fungos. O colapso dessa célula fúngica leva à interrupção do crescimento micelial (GHINI; KIMATI, 2000).

O fato dos fungicidas triazóis serem um grupo químico relativamente novo, visto que foram introduzidos no mercado na década de 1970, também pode explicar a alta sensibilidade dos isolados de *C. lindemuthianum* a esses fungicidas. Nesse período estavam ocorrendo os primeiros problemas com outros sistêmicos devido à resistência, devido a isso, testes de avaliação de risco em laboratório foram realizados demonstrando uma menor probabilidade de falha no controle do que os demais produtos. Entretanto, mais tarde foram feitos diversos relatos de resistência para importantes doenças (HOLLOMON, 1993).

Entre as características que tornam os fungicidas triazóis dos mais importantes encontra-se a elevada ação inibitória sobre a formação de componentes da membrana celular, rápida absorção e translocação na planta, eficiência em pequenas doses, ação curativa, efeito residual prolongado, amplo espectro de ação, flexibilidade para uso em tratamento de sementes e parte aérea com moderado risco de resistência (FORCELINI, 1994).

Mesmo não havendo diferenças com relação à classificação proposta por Edgington et al. (1971), foi possível observar grande amplitude de DL_{50} entre os isolados e também entre os dois fungicidas, demonstrando que o monitoramento da sensibilidade de diferentes populações desse patógeno ao longo dos anos é importante para o realizar o acompanhamento dessa variação de DL_{50} com relação aos triazóis. De Waard (1994) explica que a avaliação da resistência aos fungicidas inibidores de esteróis é difícil, visto que o nível de resistência é freqüentemente

baixo e o seu desenvolvimento só será detectado a partir de estudos preliminares que ofereçam valores de referência.

No caso da antracnose, existem trabalhos que avaliam a eficiência de fungicidas triazóis isolados ou em mistura com fungicidas de outros grupos químicos, mas não os que avaliam a DL_{50} de triazóis *in vivo*. De acordo com Zadoks & Schein (1979) argumentos estatísticos comprovam que a DL_{50} é mais precisa para comparar a eficácia de compostos fungicidas em termos de concentração. Hassal (1990) explica que a DL_{50} é um índice mais sensível de toxicidade que outra dose qualquer e é usualmente adotada como um padrão de comparação da relativa toxicidade de uma substância, expressa por mg/kg (ou $\mu\text{g/g}$) ou parte por milhão (ppm).

Os trabalhos disponíveis sobre avaliação da sensibilidade a triazóis, mesmo em outros patossistemas, utilizam a metodologia *in vitro*, que não parece adequada no caso desse grupo de fungicidas. Esse fato foi reforçado no trabalho realizado por Stolte (2006), onde foi confirmado que a germinação dos esporos normalmente não é inibida por fungicidas triazóis. O fato de testes de sensibilidade a triazóis apresentarem melhores resultados quando realizados *in vivo*, pode estar relacionado ao fato do esporo possuir reserva de ergosterol para a emissão inicial do tubo germinativo (PONTZEN; SCHEINPFLUG, 1989), podendo esta ser consumida até que o esporo consiga nova fonte de energia para continuar seu ciclo.

A utilização dos fungicidas tebuconazole e poxiconazole para o controle da antracnose do feijão já foi comprovada em vários trabalhos. Rava (2002) testou vários produtos para o controle da antracnose: carbendazin + epoxiconazole, tiofanato metílico + epoxiconazole, piraclostrobina, piraclostrobina + epoxiconazole e tebuconazole, comprovando a eficiência dos triazóis e misturas de triazóis com benzimidazóis e estrobilurinas no controle da doença.

Da totalidade de isolados avaliados no presente trabalho, destacam-se além da raça 321 (figura 11), que apresentou moderada sensibilidade ao fungicida epoxiconazol, as raças 08 (figura 12) e 65 (figura 13), que apresentaram valores de DL_{50} relativamente altos para o tebuconazole considerando os demais isolados. O mesmo ocorreu com a raça 81 (figura 14), quando submetida ao fungicida epoxiconazole. Os demais isolados apresentaram resultados dentro de uma faixa uniforme de DL_{50} .

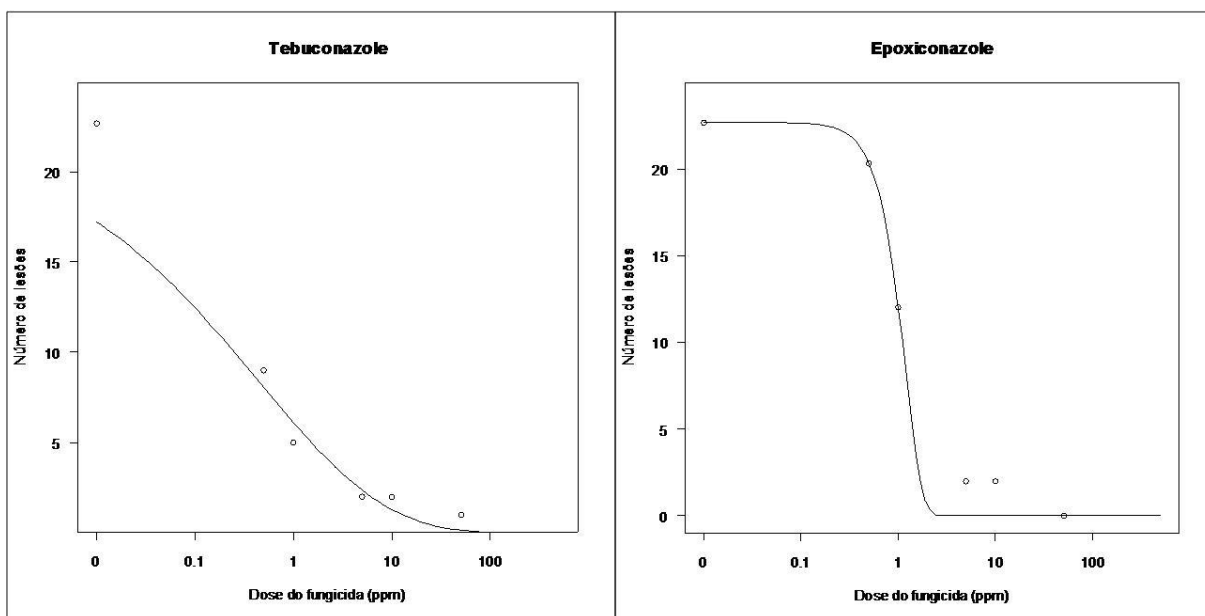


Figura 11 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 321, submetidos a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

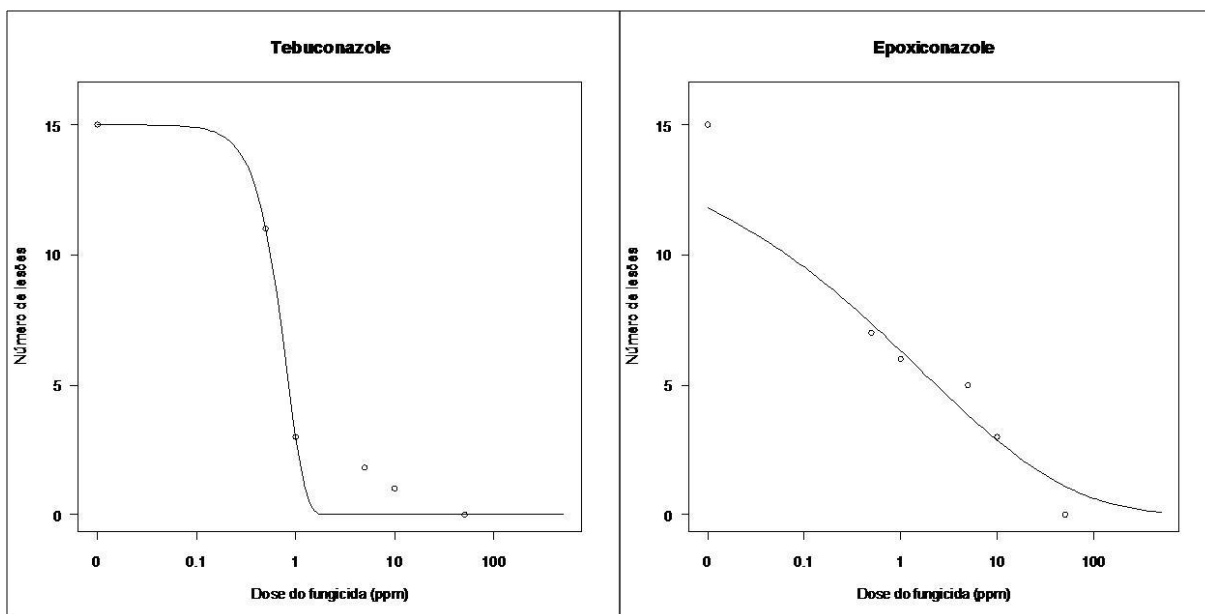


Figura 12 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 08, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

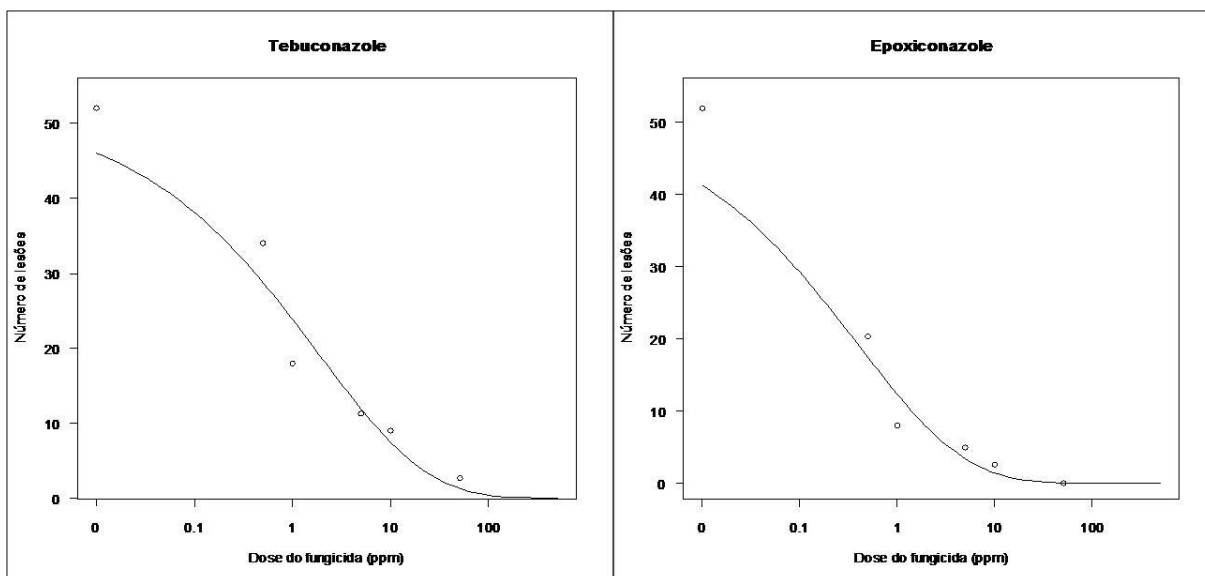


Figura 13 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, submetidos a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

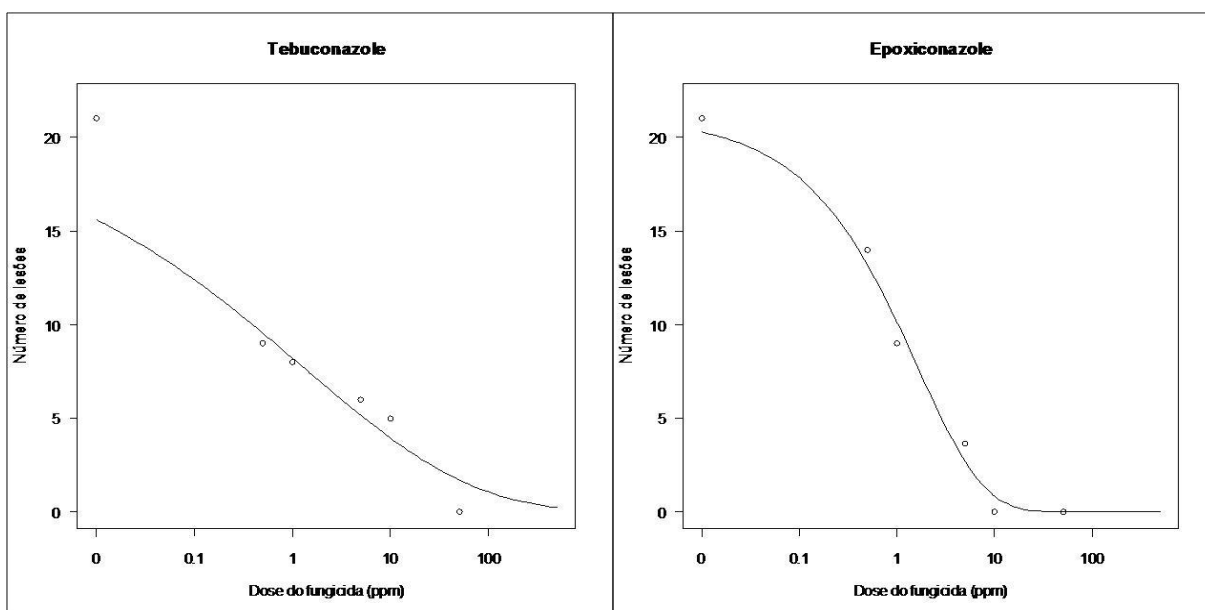


Figura 14 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 81, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

O efeito sobre a inibição do aparecimento e crescimento de lesões dos fungicidas epoxiconazole e tebuconazole também foi comprovado no caso de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto, onde Ferreira et al. (2006) concluíram

que epoxiconazole, epoxiconazole+pyraclostrobin, pyraclostrobin e tebuconazole reduziram a severidade da doença, independentemente da concentração utilizada.

Ito et al. (1999) avaliaram a eficiência do fungicida tebuconazole associado a outros produtos, observando que o melhor controle da antracnose foi proporcionado por tebuconazole + trifenil hidróxido de estanho e tebuconazole, concordando com os resultados encontrados para esse fungicida, e mostrando que mesmo sendo utilizado isoladamente para o controle da doença, ainda não foram relatados casos de resistência de *C. lindemuthianum* a esse fungicida, e dentre os isolados avaliados nenhum apresentou baixa sensibilidade ou insensibilidade aos princípios ativos testados.

Dessa forma, é necessário salientar que para o tipo de resistência poligênica, trabalhos de avaliação de sensibilidade são de grande importância na indicação de risco, pois de acordo com Ghini; Kimati (2000) nesse caso a resistência surge pela mudança gradual da sensibilidade. Os passos iniciais desse processo podem ser detectados por testes de sensibilidade, pois segundo esses autores, poucas amostras são necessárias.

Sendo a antracnose do feijoeiro uma doença com grande capacidade destrutiva e que, dependendo das condições ambientais e do inoculo inicial, pode ser endêmica, a exemplo de doenças como a requeima da batata (*Phytophthora infestans*) e a ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), onde são feitos monitoramentos constantes da sensibilidade desses patógenos diante dos fungicidas, é de grande importância que esse tipo de avaliação seja repetido a cada safra, para que se possa acompanhar a variação na sensibilidade desse patógeno frente aos fungicidas utilizados na cultura do feijão.

Dessa forma, Dekker (1995) explica que mudanças graduais de sensibilidade podem ocorrer nas populações de fungos dependendo do uso dos fungicidas, sendo assim, o monitoramento tem o papel de verificar se as estratégias anti resistência estão sendo efetivas.

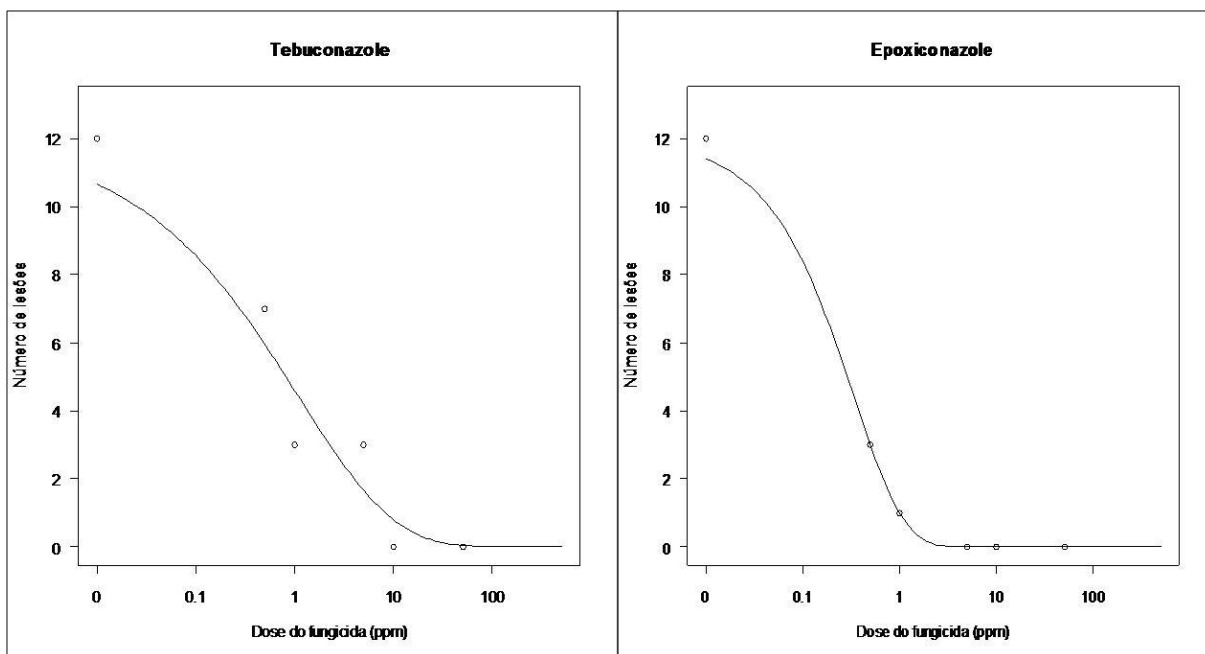


Figura 15 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, isolado CL 837, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

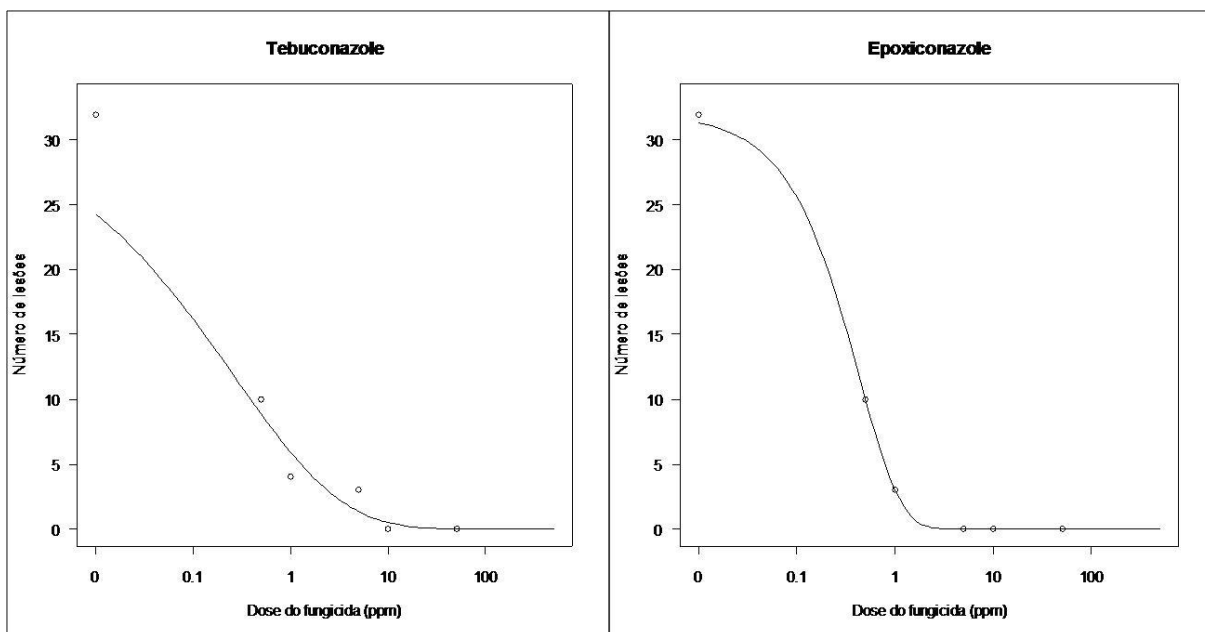


Figura 16 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, isolado CL 1135, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

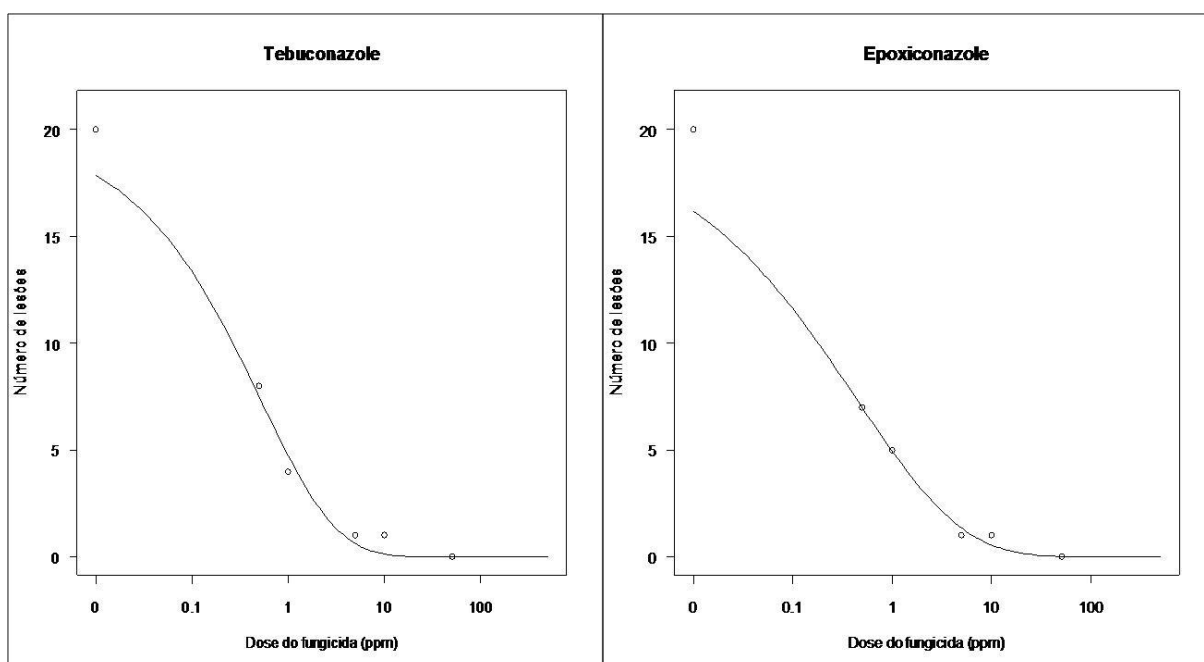


Figura 17 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 337, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

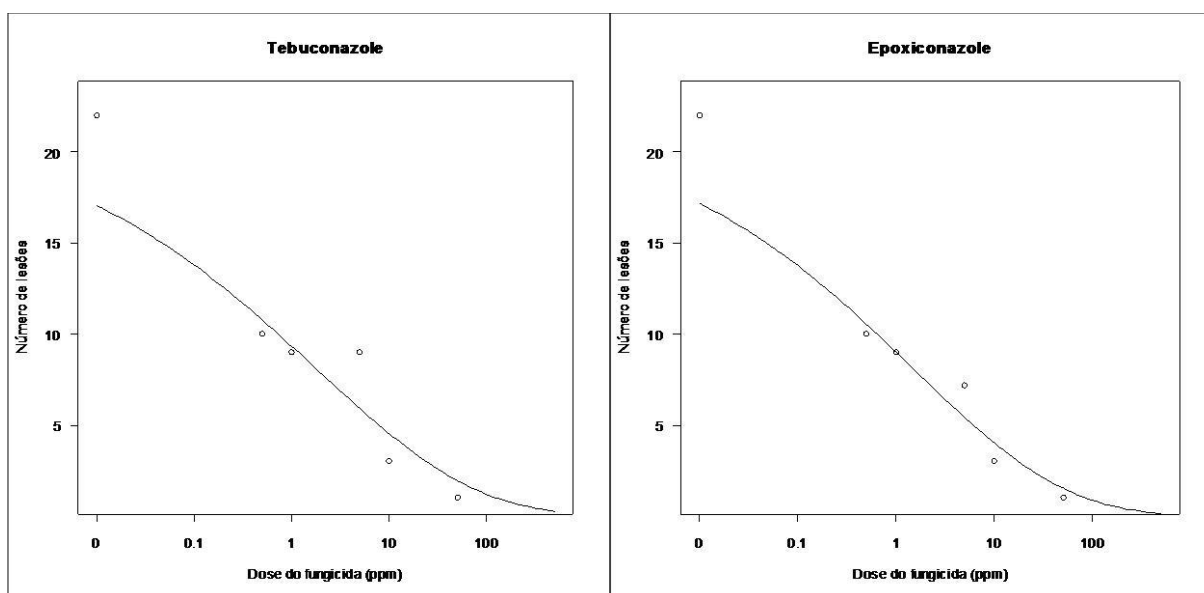


Figura 18 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, isolado W 25, submetido a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

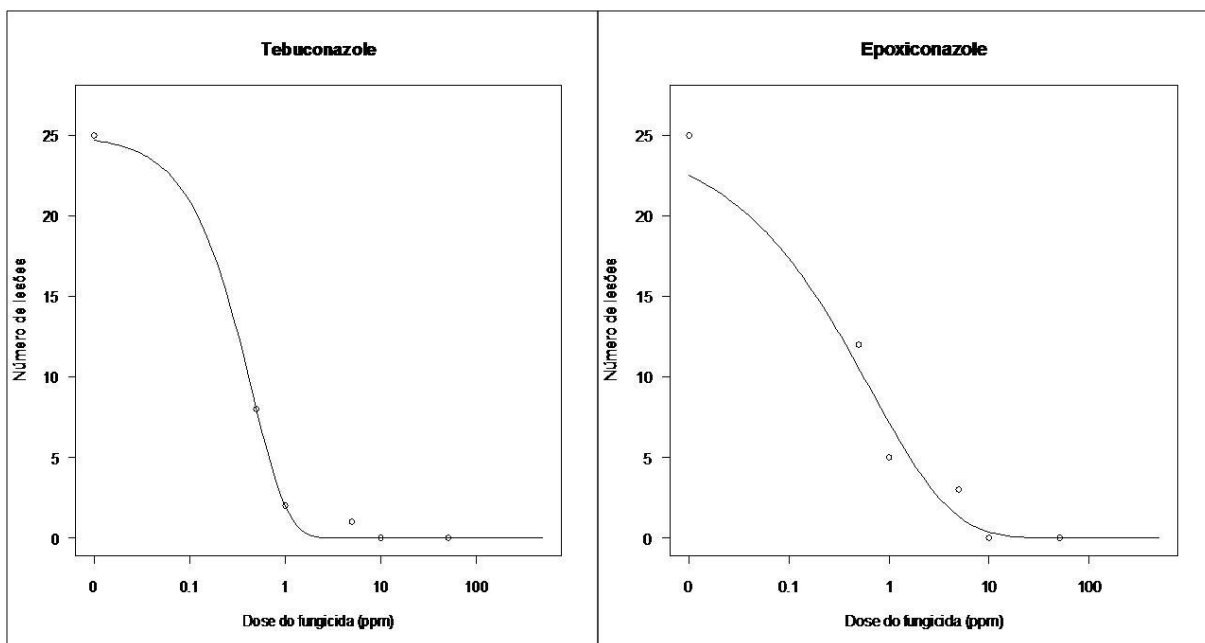


Figura 19 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, isolado W 183, submetidos a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

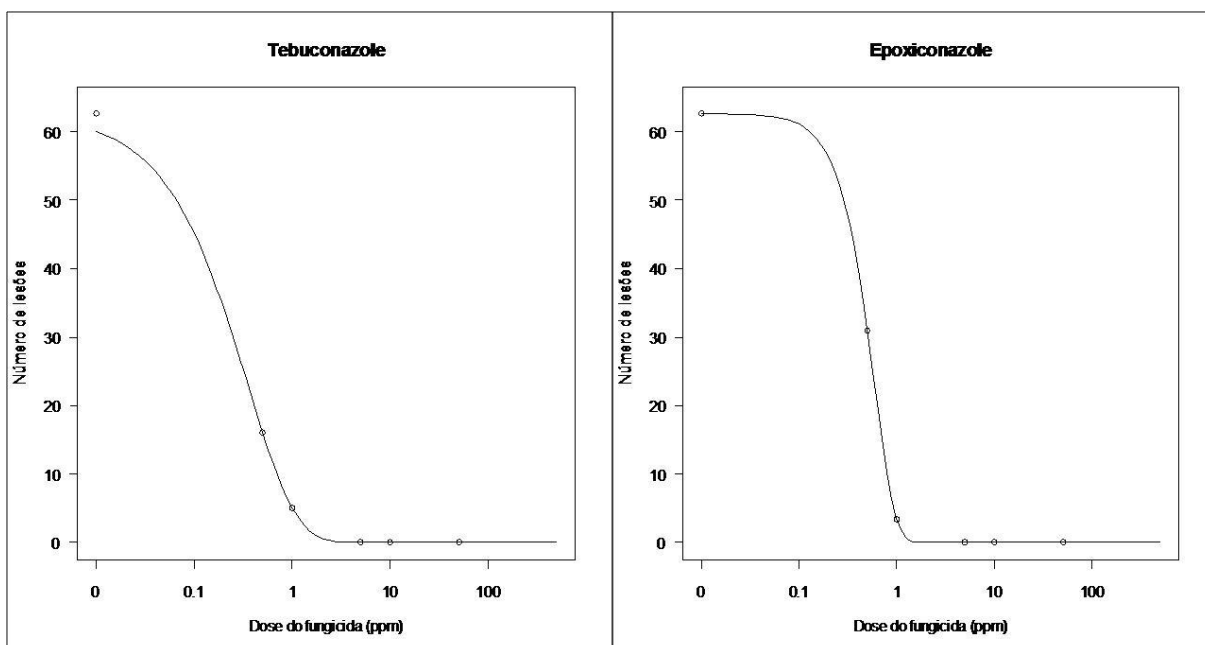


Figura 20 Número de lesões por trifólio de *Colletotrichum lindemuthianum*, isolado B 01, submetidos a cinco concentrações dos fungicidas tebuconazole e epoxiconazole. Santa Maria, RS. 2009.

6 CONCLUSÕES

- A perda de sensibilidade de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* está relacionada a distribuição e ocorrência das raças fisiológicas nas principais regiões produtoras de feijão;
- Raças com maior frequência podem sofrer maior pressão de seleção por parte dos fungicidas quando utilizados intensivamente no controle da antracnose, especialmente no caso dos fungicidas benzimidazóis, onde alguns isolados apresentaram moderada a baixa sensibilidade;
- Mesmo no caso de estrobilurinas e triazóis, onde não foi detectada perda de sensibilidade, o monitoramento das populações de *C. lindemuthianum* deve ser realizado periodicamente permitindo acompanhamento de possíveis alterações na sensibilidade aos fungicidas permitindo avaliar a efetividade das estratégias anti-resistência.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BALARDIN, R. S.; RODRIGUES, J. C. V. Sensibilidade in vitro de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas sistêmicos e protetores. **Fitopatologia bras.**, Brasília, v. 20, p. 494-497, 1995.

BALARDIN, R. S.; BALARDIN, C. R. R. Efeito de fungicidas para controle de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijoeiro comum. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 19-23, 1994.

BRENT, K. J. **Fungicide resistance in crop pathogens**: how can it be managed. Brussels: GIFAP, 1995. 48 p. (FRAC Monograph, n.1).

BURDON, J. J.; JAROSZ, A. M. Host-pathogen interactions in natural populations of *Linum marginale* and *Melampsora lini*: I. patterns of resistance and racial variation in a large host population. **Evolution**. 45: 205-17. 1991.

BURDON, J. J.; THOMPSON, J. N. Changed patterns of resistance in a population of *Linum marginale* and the rust pathogen *Melampsora lini*. **J. Ecol.** 83: 199-206. 1995.

BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. de. Coevolução de plantas e fungos fitopatogênicos. **Rev. Bras. de Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 79-83 mai-agosto, 2001.

BURDON, J. J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 664-669, 1997.

CARBONELL, S. A. M. et al. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia bras.** Brasília, v. 24, n. 1, p. 60-65, 1999.

DE WAARD, M. A. Resistance to Fungicides Which Inhibit Sterol 14 - Demethylation, an Historical Perspective. in: HEANEY, S.; SLAWSON, D.; HOLLomon, D. W.; SMITH, M.; RUSSELL, P. E.; PARRY, D. W. Fungicide Resistance. Farnham: **The British Crop Protection Council**. p. 3-10. 1994.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**. St. Paul, v. 61, p. 42-44, Jan. 1971.

ITO, M. F., CASTRO, J. L. de; SANTINI, A. Eficiência de tebuconazole associado a outros fungicidas, no controle da antracnose e mancha-angular do feijoeiro. in REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 6. 1999, Salvador, BA. **Resumos expandidos...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa arroz e feijão, 880 p. 185-187, 1999.

FERREIRA, E. M. et al. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. **Fitopatologia bras.** Brasília, v. 31, n. 5, Oct. 2006

FORCELINI, C. A.; GOELLNER, C. I.; MAY-DE MIO, L. L. Resistência de fungos a fungicidas. in: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 9: **Anais...** 339-381. 2001.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GISI, U. et al. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide,MI and strobilurin fungicides. **Crop protection** 19: 863-872. 2000.

HASSAL, K. A. **The Biochemistry and Uses of Pesticides** – Structure, Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection. Ed. 2. New York: VCH Publishers, 1990, 536 p.

HOLLOMON, D. W. **Resistência a Fungicidas – Definições e Conceitos**. Disponível em <<http://www.frac-brasil.org.br/>>. Acesso em: 14 out. 2008.

HUBBELING, N. The new iota race of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Annu. Rep. Bean Improv. Coop.** 20:58. 1977.

JAROSZ, A. M. & BURDON, J. J. Host-pathogen interactions in natural populations of *Linum marginale* and *Melampsora lini*: II. Local and regional variation in patterns of resistance and racial structure. **Evolution** 47: 1618-27. 1991.

KENDALL, S.; HOLLOMON, D. W.; ISHII, H.; HEANEY, S. P. Characterization of benzimidazole-resistant strains of *Rhynchosporium secalis*. **Pesticide Science**, v. 40, p. 175-181, 1994.

MAHUKU, G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean 47 varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 253-263, Mar. 2004.

PICININI, E. C. Fungicidas benzimidazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 2: 357-409. 1994.

POMPEU, S. S.; DUDIENAS, C.; ITO, M. F. Linhagens de feijoeiro resistentes ao fungo da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), obtidas pelo uso dos genes *Mex2* e *Mex3*. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 18, n. 3/4, p. 220-226, 1992.

PONTZEN, R.; SCHEINPFLUG, H. Effects of Triazole Fungicides on Sterol Biosynthesis During Spore Germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. **Neth. J. Pl. Path.**: 95, Supplement 1, p. 151-160, 1989.

RAHE, J. E.; KUÆ, J. Metabolic nature of the infection limiting effect of heat on bean anthracnose. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 1005-1009, 1970.

RAVA, C. A. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. **Summa Phytopatologica**. Jaguariúna, v. 28 (1): p. 65-69, 2002.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia bras.**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, 1994.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Antracnose. in: SARTORATO A.; RAVA C. A. **Principais Doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: Embrapa, 1994. 300 p. (Embrapa-CNPAP. Documentos, 50)

REIS, E. M; FORCELINI, C. A; REIS, A. C.(2001). Classificação dos fungicidas. in: **Manual de fungicidas**. (Moura, N.R. Ed.), Florianópolis: Insular, Cap.5, pags. 25-52.

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.

RODRIGUES, M. B. C. et al . Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v. 42, n. 3, mar. 2007.

SHARVELLE, E. G. **The Nature and Uses of Modern Fungicides**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1961, 308 p.

STAUB, T.; SOZZI, D. Fungicide Resistance. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1026-1031, 1984.

SIEROSTKI H.; WULLSCHLEGER J.; GISI U. **Pest. Biochem. Physiol.** 68, 107-112, (2000).

WHEELER, I. E.; KENDALL, S. J.; BUTTERS, J.; HOLLOMON, D. W.; HALL, L. Using allele-specific oligonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis*. **Pesticide Science**, v. 43, p. 201-209, 1995.

TU, J. C. & McNAUGHTON, M. E. Isolation and characterization of benomyl-resistance biotypes of the delta race of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Can.J. Plant Science**, 60: 585-589. 1979.

TU, J. C. & JARVIS. Ontogeny, organization, and longevity of sclerotium-like structures produced by *Colletotrichum lindemuthianum* in the presence of benomyl. **Canadian Journal of Plant Pathology** 1:17-22, 1979.

ZAUMEYER, W. J.; THOMAS, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U. S. D. A. **Agr. Teach. Bull.** 1957, n. 868, 255 p.

ZADOKS, J. C.; SCHEIN, R. **Epidemiology and Plant Disease Management**. New York: Oxford University Press, 1979, 427 p.