

VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO FUNGO *BIPOLARIS SOROKINIANA* À FUNGICIDAS *IN VITRO*

Mariana Piva Castilho (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Dauri José Tessmann
(Orientador), e-mail: djtessmann@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias/Maringá, PR.

Ciências Agrárias I - Fitopatologia

Palavras-chave: Controle químico; fungo fitopatogênico; mancha marrom.

RESUMO

O fungo *Bipolaris sorokiniana* é um dos principais patógenos foliares das culturas de cevada (*Hordeum vulgare*) e trigo (*Triticum aestivum*) no Brasil, causando a doença mancha marrom. Seu controle é realizado mediante uso de fungicidas, no entanto, o uso contínuo de fungicidas com mesmos modos de ação implica na seleção de linhagens do patógeno menos sensíveis ou resistentes aos fungicidas. O objetivo do projeto foi validar um protocolo para avaliação *in vitro* da sensibilidade de isolados de *B. sorokiniana* à fungicidas, por meio a avaliação do efeito de diferentes doses dos fungicidas presentes na redução da germinação de conídios. O ensaio foi conduzido em placas de cultura de células de 24 poços contendo meio de cultura de ágar-água e fungicidas dos grupos químicos triazol (DMI) e estrobilurina (QoI) em diferentes concentrações. Sobre o meio e cultura, no centro de cada poço foi depositado uma suspensão de conídios. O ensaio teve delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e cinco isolados foram avaliados após 24 horas da incubação. Os dados dos percentuais de germinação foram submetidos à análise de regressão e posteriormente foi calculada a concentração inibitória de 50% da germinação de conídios (CI₅₀). Os resultados revelaram que os cinco isolados expostos ao DMI não foram sensíveis ao fungicida, já quando expostos a QoI mostraram CI₅₀ média de 4 ppm. Também foi observada a diferença na sensibilidade entre isolados de *B. sorokiniana* ao fungicida azoxistrobina. Conclui-se a validação do protocolo, além disso, o estudo revelou que não ocorreu o controle do fungo pelo fungicida ciproconazol e a eficiência do fungicida azoxistrobina.

INTRODUÇÃO

O fungo *Bipolaris sorokiniana* é agente causal da mancha marrom, uma das principais doenças foliares que afeta as culturas de cevada (*Hordeum vulgare*) e trigo (*Triticum aestivum*) no sul do Brasil. A doença ataca folhas, colmos e espigas do trigo e cevada, causando manchas necróticas nas folhas, o que resulta na redução da área fotossintética da planta (INFORMAÇÕES TÉCNICAS... 2022).

A principal medida de controle da doença é a aplicação de fungicidas na parte aérea, bem como o tratamento químico das sementes. As cultivares de trigo e cevada comerciais apresentam susceptibilidade à doença, o que exige aplicações regulares de fungicidas nas lavouras a fim de mitigar seus danos. Os fungicidas utilizados no controle da doença são do grupo dos inibidores da desmetilação (DMI, “triazóis”) e inibidores da quinona externa (QoI, “estrobilurinas”) isoladamente ou em misturas comerciais.

O uso continuado de fungicidas com mesmo modo de ação numa mesma lavoura ou região pode resultar na seleção de linhagens de *B. sorokiniana* que apresentam menor sensibilidade ou resistência aos fungicidas. Tal fato já foi constatado no sul do Brasil em relação a fungicidas DMI (STOLTE, 2006).

O objetivo do projeto foi validar um protocolo para avaliação *in vitro* da sensibilidade de isolados de *B. sorokiniana* à fungicidas, por meio a avaliação do efeito de diferentes doses dos fungicidas presentes na redução da germinação de conídios

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da UEM utilizando sete isolados da coleção de fungos de *B. sorokiniana*. Foram cultivados em placas de Petri contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA - 50 g de batata, 17 g de ágar bacteriológico e 20 g de dextrose em 1000 ml de água) por 7 dias na temperatura de 22 °C e fotoperíodo de 12 horas. Das culturas foram coletados discos fragmentos de micélio de 9 mm de diâmetro e transferidos para o centro de placas de Petri com meio V8-ágar (150 ml de suco V-8, 3 g de CaCO₃, 15 g de ágar bacteriológico, 10 g de BDA e 850 ml de água). As placas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento na temperatura de 22±2 °C, nos sete primeiros dias mantidas no escuro e até completar 14 dias de incubação com fotoperíodo de 12 horas com luz negra.

A suspensão de esporos foi calibrada a 5x10⁴ conídios por mL. O ensaio do efeito de diferentes doses de fungicida na germinação de conídios de *B. sorokiniana* foi realizado em placas de cultura de células de 24 poços contendo meio de cultura BDA com diferentes concentrações do fungicida do grupo químico DMI tendo como ingrediente ativo o ciproconazol [0; 1; 10; 20 e 40] ppm. O fungicida do grupo químico QoI foi a azoxistrobina, avaliada nas concentrações de 0; 1; 5; 10 e 20 ppm. As testemunhas possuíam apenas o meio BDA sem fungicida. No centro de cada poço foi depositado 40 microlitros de suspensão de conídios e incubado por 24 horas a 22±2 °C. A avaliação da germinação dos conídios foi realizada pela contagem de 100 esporos em cada poço da placa de cultura de células. Foi considerado germinado o esporo que apresentava tubo germinativo com o comprimento igual ou maior do que o diâmetro do conídio. Para a paralisação do crescimento do tubo germinativo foi adicionado corante Azul de Amam, conforme metodologia empregada por Stolte (2006) e Reimann e Deising (2005). Os dados dos percentuais de germinação foram submetidos à análise de regressão e posteriormente foi calculada a concentração inibitória de 50% da germinação de conídios (CI₅₀) e submetida a análise de variância e teste de média LSD com o Software R (R CORE TEAM, 2022).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungicida ciproconazol não mostrou controle da germinação de conídios dos isolados de *B. sorokiniana*. A análise de regressão da sensibilidade *in vitro* dos isolados (Figura 1) mostra que na concentração máxima de 30 ppm do ingrediente ativo não alcançou a CI_{50} . Os dados revelam a baixa sensibilidade dos isolados do estudo ao ingrediente ativo ciproconazol. A resistência de *B. sorokiniana* a fungicidas DMI já foi relatada anteriormente no sul brasileiro (STOLTE, 2006).

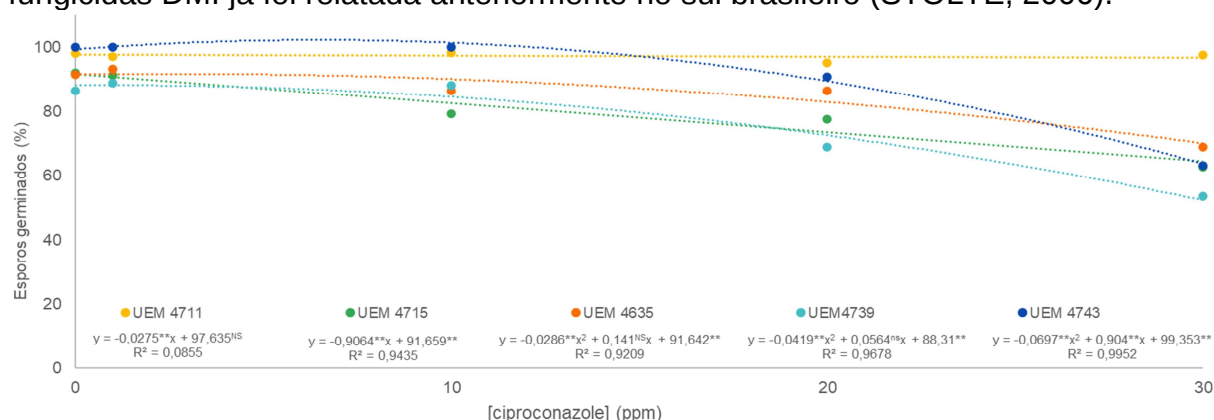


Figura 1 – Análise de regressão da sensibilidade *in vitro* dos isolados UEM 4711, UEM4715, UEM4635, UEM 4739 e UEM 4743 de *Bipolaris sorokiniana* as concentrações de 0, 1, 10, 20 e 30 ppm do fungicida ciproconazol.

Em relação ao fungicida azoxistrobina, a análise de regressão da sensibilidade *in vitro* dos isolados de *B. sorokiniana* (Figura 2) revela a correlação negativa entre germinação de conídios e aumento de doses de azoxistrobina, onde, na dose de 10ppm a germinação de quatro dos cinco isolados foi controlada.

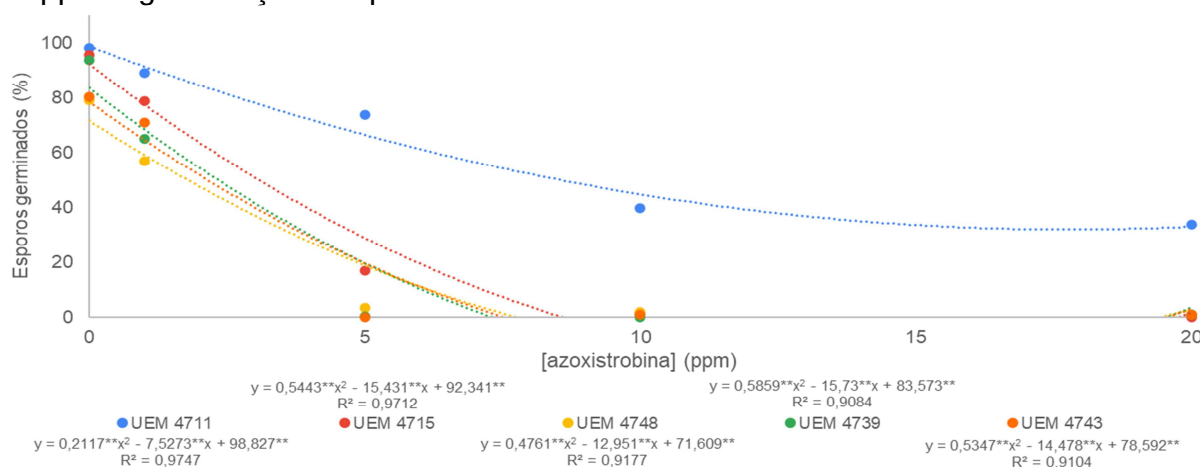


Figura 2 – Análise de regressão da sensibilidade *in vitro* dos isolados UEM 4711, UEM4715, UEM4748, UEM 4739 e UEM 4743 de *Bipolaris sorokiniana* as concentrações de 0, 1, 5, 10 e 20 ppm do fungicida azoxistrobina.

A análise de variância da CI_{50} dos isolados (Tabela 1) mostrou diferenças significativas ($p=0,01$) na sensibilidade entre os isolados expostos ao fungicida azoxistrobina. A sensibilidade dos isolados teve uma média de 4,0 ppm e variou de 2,5 ppm a 8,8 ppm do fungicida.

Tabela 1 Concentração inibitória de 50% da germinação de conídios (CI_{50}) de isolados de *Bipolaris sorokiniana* ao fungicida Qol azoxistrobina.

Isolado	CI_{50} Azoxistrobina
UEM4711	8,8 a
UEM4715	3,2 b
UEM4943	3,0 b
UEM4748	2,6 c
UEM4739	2,5 c
Média	4,0
p-valor	<0.001***
CV%	5,8

Médias seguidas de mesmas letras maiúscula nas linhas e mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa LSD ($p<0,01$).

CONCLUSÕES

O protocolo de avaliação de sensibilidade de isolados de *B. sorokiniana* à fungicidas foi validado e relevou que o fungicida ciproconazol não controlou a germinação de conídios dos isolados do estudo. Já o fungicida azoxistrobina controlou os isolados havendo diferenças na sensibilidade ao ingrediente ativo entre isolados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa contemplada.

REFERÊNCIAS

INFORMAÇÕES TÉCNICAS PARA TRIGO E TRITICALE: 14ª REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. 1. ed. -- Castro, PR: Fundação ABC e Biotrigo Genética, 2022.

R CORE TEAM (2022) R: A language and environment for statistical computing, Vienna. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acessado 10 dezembro 2022.

REIMANN, S., DEISING, H. B. Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(6), 3269- 3275. 2005.

STOLTE, R. E. **Sensibilidade de *Bipolaris sorokiniana* e de *Drechslera tritici-repentis* a fungicidas 'in vitro'**. Universidade de Passo Fundo (Programa de Pós-Graduação em Agronomia). Dissertação de Mestrado. 92.p. 2006.