

Metodologia para detecção rápida de sensibilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* aos fungicidas Carbendazim e Picoxistrobina

Fernanda Yoshida¹, Elder Tadeu Barbosa², Murillo Lobo Junior³

O controle químico pode viabilizar a obtenção de altas produtividades de feijão comum, com níveis satisfatórios de controle de doenças. Porém, o uso consecutivo de um mesmo ingrediente ativo pode provocar com o tempo o surgimento de linhagens de fungos resistentes a esses compostos. Essa redução da sensibilidade aos fungicidas envolve mutações genéticas, e assim, surgem populações tolerantes a estes produtos. Por este motivo, o monitoramento da resistência aos fungicidas é uma área importante nas pesquisas relacionadas ao manejo integrado de doenças e, além de orientar o manejo de doenças, pode evitar também o aumento de custos com aplicações excessivas e a contaminação ambiental e da produção agrícola. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para detecção rápida de resistência de *Colletotrichum lindemuthianum* aos fungicidas carbendazim e picoxistrobina, registrados no MAPA para controle da antracnose do feijão-comum. O método proposto utiliza microplacas de poliestireno transparente com 96 poços e o corante Alamar Blue (AB). AB é um corante indicador de viabilidade celular estável, solúvel em água, atóxico a fungos e humanos. Para ajustar o método, foram analisados 30 isolados de *C. lindemuthianum* recuperados da coleção de fungos e microrganismos funcionais da Embrapa Arroz e Feijão, provenientes dos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Bahia, Sergipe e do Distrito Federal. Foram utilizadas três diferentes concentrações de inóculo, em água destilada, do patógeno (1×10^2 , 10^3 e 10^4 conídios mL⁻¹), previamente multiplicado em vagens de feijão autoclavadas e incubadas por 15 dias a 25 °C, e fungicidas carbendazim e picoxistrobina nas concentrações de 10, 100 e 1000 ppm em meio líquido Czapek, a 0,05% de ágar. Com as combinações entre as suspensões de esporos e soluções dos fungicidas nas suas respectivas concentrações, mais as testemunhas propostas, foram obtidos 32 tratamentos para cada isolado. Para as testemunhas, foi utilizada água destilada autoclavada e meio de cultura Czapek 0,05% de ágar. Os ensaios foram realizados com a distribuição de 60 µl de suspensão de esporos + 10 µl do corante AB + 140 µl da suspensão do fungicida nas microplacas, com o auxílio de uma micropipeta multicanal. Após o preparo, as placas foram vedadas com filme plástico para evitar contaminação e incubadas no escuro, a 25 °C. Foram realizadas quatro leituras em espectrofotômetro Epoch (Biotek, Vermont - EUA), após 72, 96, 120 e 144 horas, nos comprimentos de ondas de 570 e 600 nm, com auxílio do programa Gene 5 2.0. Após a leitura das absorbâncias, a porcentagem de redução do AB foi estimada conforme a fórmula: % de redução do AB = $[(O2 \times A1) - (O1 \times A2)] / [(R1 \times N2) - (R2 \times N1)] \times 100$, onde O1 = coeficiente de extinção molar (E) de AB oxidado (azul) a 570 nm; O2 = E de AB oxidado a 600 nm; R1 = E de redução de AB (rosa) em 570 nm; R2 = E de redução de AB em 600 nm; A1 = absorbância de poços de teste em 570 nm; A2 = absorbância de poços de teste em 600 nm; N1 = absorbância do controle negativo em 570 nm, e N2 = absorbância do controle negativo a 600 nm. Quando o patógeno é capaz de metabolizar o fungicida, ocorre uma colorimétrica de intensidade variável, de modo que a redução do AB do azul ao rosa, formado quando há uma maior resistência ao fungicida. De acordo com a análise de variância, a reação é afetada pelas concentrações de inóculo e de fungicida e também pelo tempo de incubação ($p < 0,001$), com interação entre estes fatores. Este método demonstrou ser rápido e eficiente na detecção de diferentes níveis de sensibilidade de *C. lindemuthianum* aos fungicidas carbendazim e picoxistrobina, além de apresentar baixo custo, com pouca necessidade de espaço físico e mão de obra, ao contrário do método tradicional com o uso de ágar em placas de Petri.

¹ Estudante de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás, bolsista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, fernandayoshida@gmail.com

² Farmacêutico, assistente da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, elder.barbosa@embrapa.br

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, murillo.loblo@embrapa.br