

Metodologia para detecção rápida de resistência de *Trichoderma* spp. ao fungicida Carbendazim

Fernanda Yoshida¹, Elder Tadeu Barbosa², Renan Macedo¹, Tariane Alves Machado¹, Murillo Lobo Junior³

Os agentes de controle biológico de doenças podem ser afetados pela exposição a produtos fitossanitários, utilizados na produção agrícola convencional. É possível que os fungicidas, inseticidas e herbicidas matem os conídios do agente de biocontrole *Trichoderma* spp., causando a redução de sua eficiência no campo. Por ser importante obter isolados com resistência aos insumos especialmente danosos a este bioagente, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia rápida para seleção de isolados de *Trichoderma* spp. resistentes ao Carbendazim, fungicida sistêmico de amplo espectro de ação. O método proposto utiliza microplacas de poliestireno transparentes com 96 poços e o corante Alamar Blue (AB), um indicador de viabilidade celular solúvel em água, atóxico a fungos e humanos. Quando o patógeno é exposto a um fungicida e é capaz de utilizá-lo como única fonte de carbono, ocorre a redução do corante, sendo esta reação colorimétrica, de intensidade variável, com passagem da cor azul à rosa, que caracteriza a maior resistência ao fungicida. Para ajustar o método, foram analisados 79 isolados de *Trichoderma* spp. da coleção de fungos e microrganismos funcionais da Embrapa Arroz e Feijão, provenientes de diversos estados do Brasil, como Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Tocantins. Foram avaliadas três concentrações de inóculo do antagonista (1×10^5 , 10^6 e 10^7 conídios de *Trichoderma* spp. mL⁻¹), e o fungicida Carbendazim nas concentrações de 10, 100 e 1000 ppm suspensos em meio líquido Czapek com 0,05% de ágar. Com as combinações entre as suspensões de conídios e soluções dos fungicidas e testemunhas em esquema fatorial 4×4 , cada isolado foi submetido a 16 tratamentos. Para as testemunhas, foi utilizada água destilada autoclavada e meio Czapek + 0,05% de ágar. Os ensaios foram realizados com a distribuição de 60 μ l de suspensão de conídios + 10 μ l do corante AB + 140 μ l da suspensão do fungicida em cada poço das microplacas. Em seguida, as placas foram vedadas e incubadas no escuro, a 25 °C. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro, após 72, 96 e 120 horas, com absorbância em 570 e 600 nm estimada 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 ; O2 = coeficiente de extinção molar (E) de AB oxidado a 600 nm; A1 = absorbância de poços de teste em 570 nm; O1 = E de AB oxidado (azul) a 570 nm; A2 = absorbância de poços de teste em 600 nm; R1 = E de redução de AB (rosa) em 570 nm; N2 = absorbância do controle negativo a 600 nm; R2 = E de redução de AB em 600 nm; e N1 = absorbância do controle negativo em 570 nm. Após a análise de variância dos resultados, verificou-se que 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. Observou-se que a maioria dos isolados apresentaram alta sensibilidade ao fungicida, encontrando-se apenas 15% de resistentes ao Carbendazim em 1000 ppm. De acordo com testes de agrupamento e análise da distância euclidiana dos *Trichodermas* resistentes com os seus locais de origem, não há relação entre resistência e origem geográfica dos isolados. O método proposto demonstrou ser rápido e eficiente na detecção de resistência de *Trichoderma* spp. ao fungicida Carbendazim, além de apresentar baixo custo, com pouca necessidade de espaço físico e de mão-de-obra e baixa geração de resíduos tóxicos, em comparação com o contrário do método laboratorial mais utilizado, que utiliza meio agarizado 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.lobo@embrapa.br