

21 P.C.



7996

13239

COMUNICAÇÕES

p. e. h. e. : abacaxi, fungida, doença; fusariose; ananás comusus
EMCAPA

ii kth

RESISTÊNCIA DE *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* AO BENOMYL

BIVANILDA A. SANTOS¹, LAÉRCIO ZAMBOLIM¹, JOSÉ A. VENTURA² & FRANCISCO X. R. VALE¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa, MG, e-mail: zambolim@mail.ufv.br; ²Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária, Caixa Postal 391, CEP 29010-901, Vitória, ES.

(Aceito para publicação em 27/07/99)

R. 436-39

Autor para correspondência: Laércio Zambolim

cuters

SANTOS, B.A., ZAMBOLIM, L., VENTURA, J.A. & VALE, F.X.R. Resistência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl. Fitopatologia Brasileira 24:436-439. 1999.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a resistência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl. Vinte e um isolados do patógeno obtidos de mudas provenientes das regiões produtoras de Itapemirim e Marataízes- ES foram testados *in vitro* e *in vivo* quanto à sua resistência a diferentes concentrações de benomyl (0, 10, 100, 500 e 1000 µg.ml⁻¹). Quatro isolados de *F. subglutinans* f. sp. *ananas* foram resistentes à concentração de 1000 µg.ml⁻¹ de benomyl. A DL₅₀ dos isolados resistentes foi de 288, 190, 119 e 109 µg.ml⁻¹

para os isolados E272, E274, E279 e E283, respectivamente. Esses resultados sugerem que *F. subglutinans* f. sp. *ananas* tem-se tornado resistente ao fungicida devido ao uso constante de benomyl em condições de campo, havendo necessidade de introdução e alternância de novos fungicidas para o controle da doença.

Palavras-chave: abacaxi, fungicida, doença, fusariose, *Ananas comusus*.

ABSTRACT

Resistance of *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* to benomyl

The objective of this study was to evaluate the resistance of *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* to benomyl. Twenty one isolate of the fungus from several pineapple production areas from Itapemirim and Marataízes-ES, were tested *in vitro* and *in vivo* to evaluate their resistance to benomyl at 0, 10, 100, 500, and 1000 µg.ml⁻¹. Out of 21 isolates, four showed resistance to benomyl at 1000 µg.ml⁻¹.

The results of the DL₅₀ for the isolates E272, E274, E279, and E283 were 288, 190, 119, and 109 µg.ml⁻¹, respectively. These results showed that populations of *F. subglutinans* f. sp. *ananas* are becoming resistant due to the constant use of benomyl on pineapple fields, and it is suggested the use of new fungicides for disease management.

O benomyl é um dos fungicidas recomendados para o controle da fusariose do abacaxizeiro causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* (Wollenberger & Reinking) Nelson, Tousson & Marasas f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim & Gilbertson (Ventura *et al.*, 1979 e 1993). A ocorrência de mutantes deste patógeno ao benomyl foi observada recentemente em algumas áreas de plantio comercial no Estado do Espírito Santo (Ventura *et al.*, 1994), indicando a necessidade de estudos mais detalhados para se caracterizar com segurança a abrangência destes mutantes em lavouras comerciais. A disseminação de isolados do fungo resistentes aos benzimidazóis pode comprometer a utilização desse grupo de fungicidas e explicar a perda de eficiência no controle da doença com benomyl (Ventura *et al.*, 1994).

cia de surgimento de organismos resistentes. Esta resistência geralmente aparece em resposta ao uso constante dos fungicidas desse grupo, ou dos relacionados quimicamente ou com o mesmo mecanismo de ação antifúngica.

O objetivo desse trabalho foi avaliar 21 isolados de *F. subglutinans* f. sp. *ananas*, de diferentes locais, visando caracterizar a resistência desse fungo ao fungicida benomyl.

Becker (1988) em seus trabalhos com fungicidas sistêmicos, atribuiu ao grupo dos benzimidazóis a maior frequên-

Os isolados de *F. subglutinans* f. sp. *ananas* foram obtidos por plaqueamento de tecido doente de mudas de abacaxizeiro das cultivares Pérola e Smooth Cayenne, provenientes de áreas produtoras do Estado do Espírito Santo. Dos 21 isolados coletados, 10 foram provenientes do município de Itapemirim (E271 e E272 de Jacarandá; E273 e E274 de Brejo dos Patos; E275 a E278 de São João do Jaboti; E279 e E280 de Timbó) e 11 do município de Marataízes (E281 e E282 de Boa Vista do Sul; E283 e E284 de Imburi;

Fol. 7996
S237r
1999
ex. 13239

sta: In: Fitopatologia Brasileira v. 24, n. 3, set. 1999

11/03/2000

Fitopatol. bras. 24(3), setembro 1999

E285 de São João de Jaboti; E286 e E287 de Nova Canaã; E288 e E289 de Graúna e, E290 e E291 de Alto Maratafzes). Dos isolados citados, somente dois, o E281 e E285 foram coletados da cultivar Smooth Cayenne, os restantes da cultivar Pérola.

O controle da fusariose nas regiões onde os isolados foram coletados é feito por aplicação de benomyl durante a antese, sendo comum até oito pulverizações por safra.

Os segmentos de tecidos lesionados foram inicialmente desinfestados por imersão por 2-3 min. em solução de hipoclorito de sódio a 2% e transferidos para meio seletivo constituído de 15 g de peptona, 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 1 g de pentacloronitrobenzeno (PCNB 75%), 20 g de ágar e 1 L de H_2O (Dhingra & Sinclair, 1985). O meio foi previamente autoclavado e, quando a temperatura atingiu aproximadamente 45 °C, foram adicionados 200 mg de cloranfenicol e 200 mg de sulfato de estreptomicina. As placas de Petri com os fungos foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Para os testes de patogenicidade dos isolados e o estudo de resistência ao benomyl, discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo meio de BDA e incubados a 25 °C no escuro por sete dias.

Os isolados em estudo foram submetidos ao teste de patogenicidade realizados inoculando-se a base de folhas do tipo E (folha adulta), destacadas de abacaxizcira da cultivar 'Pérola' (suscetível) (Ventura, 1994). Com o auxílio de um dispositivo com 60 agulhas entomológicas, foram feitos ferimentos com 5 mm de diâmetro, onde discos de meio com inóculo (microconídios e micélio) com 5 mm de diâmetro foram depositados. Cada inoculação foi repetida cinco vezes em folhas diferentes, seguindo o delineamento inteiramente casualizado. Como testemunha foram utilizados discos de BDA sem o fungo. Todos os testes foram repetidos três vezes. As folhas foram mantidas em câmara úmida à temperatura de 28 °C.

A avaliação final da patogenicidade foi realizada aos 12 dias, anotando-se a existência de lesão, necrose e exsudação.

Os isolados do patógeno foram cultivados durante sete dias em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, para verificar a inibição da germinação dos conídios por benomyl. Para o preparo da suspensão de microconídios do fungo, foi realizada raspagem das placas em água destilada esterilizada, sendo a concentração ajustada para 10^6 conídios/ ml^{-1} utilizando-se hemacitômetro.

Os tratamentos consistiram na mistura (1:1) da suspensão de microconídios e da solução contendo benomyl, obtendo-se as concentrações de 0, 10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ do produto comercial, após o que os tubos foram incubados a 25 °C durante 14 h. Cada tratamento foi composto de cinco repetições no delineamento inteiramente casualizado. A avaliação foi feita por contagem de 100 microconídios por repetição, em hemacitômetro. Esse experimento foi repetido três vezes. Os dados foram comparados por meio da análise de Probit, com o cálculo da dose letal para 50% dos conídios (DL_{50}). Considerou-se como germinado, o microconídio que apresentava comprimento do tubo germinativo, maior do que o seu diâmetro.

Para avaliação do crescimento micelial, discos de micélio com 5 mm de diâmetro dos 21 isolados foram cultivados em BDA por sete dias, e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA autoclavado e benomyl nas concentrações de 0, 10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. As placas foram incubadas a 25 °C em fotoperíodo de 12 horas, e a avaliação foi realizada aos doze dias, medindo-se o crescimento radial da cultura nos dois eixos ortogonais. Foi usado o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Todos os testes foram repetidos três vezes.

A capacidade de quatro isolados resistentes e quatro sensíveis ao benomyl de provocar doença identificados in vitro, foi realizada em plantas de abacaxi por meio da inoculação em folhas da cultivar Pérola, tratadas com benomyl em diferentes concentrações. Foram utilizadas folhas do tipo E, desinfestadas superficialmente por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 2-3 min., seguida de lavagem em água destilada esterilizada. Discos de micélio dos oito isolados foram depositados sobre ferimentos de 5 mm de diâmetro, induzidos com o auxílio de um dispositivo de agulhas entomológicas, nos quais tinham sido depositados 100 μl de solução de benomyl nas concentrações indicadas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. As folhas foram incubadas em câmara úmida a 28 °C por doze dias, sendo medido o diâmetro das lesões a partir do ponto de inoculação.

Todos os isolados testados foram patogênicos ao abacaxi. Os sintomas observados foram semelhantes àqueles produzidos em condições de campo, ocorrendo lesão do tecido infectado e exsudação de goma. Tanto na inibição da germinação dos microconídios como no crescimento micelial do fungo, houve variação significativa ($P < 0,05$) entre os diferentes isolados estudados. A resistência ao fungicida benomyl ficou evidenciada pela presença de conídios germinados nas diferentes concentrações testadas para os isolados E272, E274, E279 e E283, coletados nas localidades Jacarandá, Brejo dos Patos, Timbó e Imburi, respectivamente, todos em mudas da cultivar Pérola. Tais isolados foram resistentes ao benomyl, até mesmo na concentração de 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

O crescimento radial do patógeno ocorreu em todas as placas para os mesmos isolados (E272, E274, E279 e E283), independentemente da concentração do fungicida, sendo todos resistentes ao benomyl. Os demais isolados não cresceram nas placas, sendo considerados sensíveis ao fungicida.

O melhor ajuste dos dados de porcentagem de germinação dos conídios foi obtido com o modelo polinomial, gerando equações diferentes para cada isolado (Figura 1).

Durante a avaliação da germinação dos conídios foram observadas diferenças entre os isolados resistentes ao benomyl; à medida que se aumentou a concentração do fungicida, observou-se que os isolados E272, E274, E279 e E283 apresentaram redução na germinação dos microconídios. A testemunha apresentou maior número de esporos germinados, enquanto a maior concentração de benomyl (1000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) provocou redução significativa da germinação. A aplicação de benomyl em doses mais baixas não afetou de forma expressiva o número de esporos germinados. O isolado E272 foi o que mostrou maior porcentagem de esporos germi-

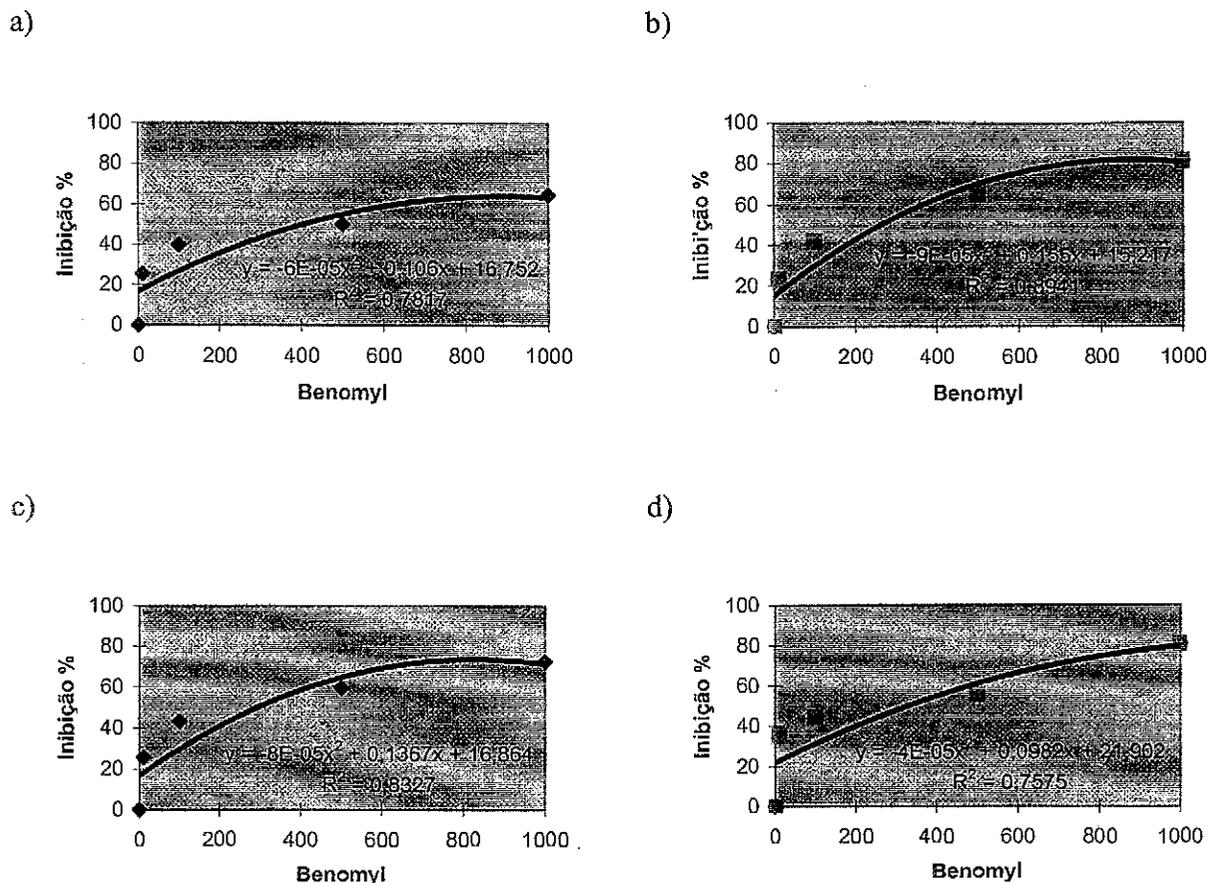


FIG. 1 - Efeito de diferentes concentrações de benomyl ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) na inibição da germinação de conídios de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, em vários isolados: a) isolado E272; b) isolado E274; c) isolado E279; d) isolado E283.

nados, seguido pelo isolado E274. A análise estatística por Probit indicou que a DL_{50} para inibição da germinação dos conídios variou entre os isolados, sendo 288, 190, 119 e $109 \mu\text{g.ml}^{-1}$ para E272, E274, E279 e E283, respectivamente.

No desenvolvimento de lesões em folhas destacadas de abacaxizeiro tratadas com benomyl, os isolados E272, E274, E279 e E283 resistentes ao fungicida causaram lesões em folhas destacadas da cultivar Pérola tratadas com benomyl, enquanto os isolados E277, E278, E285 e E290 não ocasionaram qualquer lesão nas diferentes concentrações do fungicida (Tabela 1).

Observou-se que os isolados selecionados como resistentes ao fungicida *in vitro* também demonstraram ser resistentes *in vivo*, não havendo diferenças entre os isolados em todas as concentrações de benomyl avaliadas.

Os sintomas da doença observados nas folhas inoculadas começaram a manifestar-se quatro dias após a inoculação. A exsudação de goma e a morte do tecido necrosado ocorreram aos oito dias para o isolado E283, ficando mais evidentes em todos os tratamentos a partir do décimo dia após a inoculação. Após esse período ocorreu morte das folhas em todos os tratamentos para os isolados resistentes. Foi constatado que os isolados sensíveis ao benomyl nos ensaios *in vitro* comportaram-se de forma semelhante quando testados em folhas destacadas de abacaxizeiro. Os isolados resistentes foram mais agressivos que os isolados sensíveis ao

TABELA 1- Desenvolvimento de lesão induzida por isolados de *F. subglutinans* f.sp. *ananas* resistentes (R) e sensíveis (S) ao benomyl, em folhas de abacaxizeiro da cultivar Pérola, tratadas com diferentes concentrações de benomyl.

Isolado	Concentração de Benomyl ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)				
	0,0	10	100	500	1000
E272 (R)	1,8*	1,8	1,2	1,1	1,1
E274 (R)	1,6	1,6	1,3	1,3	1,1
E277 (S)	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
E278 (S)	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0
E279 (R)	2,6	2,2	1,2	1,0	1,0
E283 (R)	1,8	1,8	1,3	1,1	1,1
E285 (S)	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0
E290 (S)	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0

* Médias de cinco repetições de três experimentos.

benomyl, sendo o isolado E283 o mais agressivo entre os resistentes.

Os isolados analisados neste trabalho foram coletados em áreas onde o benomyl vinha sendo utilizado intensiva-

mente. Os resultados obtidos confirmam aqueles verificados por Ventura *et al.* (1994), que postularam que o uso constante do benomyl por mais de quinze anos na região produtora de abacaxi, em Itapemirim, no Estado do Espírito Santo, tem feito com que os produtores aumentem a frequência de pulverizações com um único fungicida, sem contudo obterem o resultado esperado para o controle da doença.

A resistência de *F. subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl, no Espírito Santo, parece ter-se desenvolvido naturalmente devido às aplicações contínuas do fungicida, o que requer precaução para a viabilidade da cultura na região.

A metodologia utilizada neste trabalho mostrou-se eficiente, uma vez que os resultados *in vitro* e *in vivo* foram bastante coerentes, confirmando a existência de resistência de *F. subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl na principal região produtora de abacaxi do Estado do Espírito Santo.

Esses resultados confirmam o perigo iminente que este patógeno representa para a cultura do abacaxi, dado ao intenso transporte de material propagativo nas regiões produtoras e consumidoras no país. Há necessidade de trabalhos que busquem alternativas para o controle da doença, que não o uso do controle químico. É importante que seja adotada uma estratégia de anti-resistência na região produtora de abacaxi do Espírito Santo, incluindo a redução da pressão de seleção pela redução do número de aplicações de benzimidazóis, fazendo o manejo da cultura com indução floral programada e utilizando novas moléculas fungicidas. Recomenda-se ainda o monitoramento da resistência em outras áreas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, W.F. Compostos sistêmicos recomendados para o controle de doenças. In: Curso de aperfeiçoamento em agrotóxicos. Florianópolis, ACARESC. 1988.
- DELP, C.J. Resistance management strategies for benzimidazoles. In: Delp, C.J. ed. Fungicide resistance in North America. St. Paul, APS Press. 1988. p. 41-43.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1985.
- VENTURA, J.A. Fusariose do Abacaxizeiro: Caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro *in vitro* (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1994.
- VENTURA, J.A., COSTA, H. & ZAMBOLIM, L. Resistência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl em condições de campo. Fitopatologia Brasileira 19 (supl.):328. 1994.
- VENTURA, J.A., PISSARRA, T.B., BRAVIN, A.J.B., CHAVES, G.M. & MAFFIA, L.A. Eficiência de fungicidas em três períodos de aplicação no controle da fusariose do abacaxizeiro. Fitopatologia Brasileira 4: 161. 1979.
- VENTURA, J.A., ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Integrated management system for pineapple *Fusarium* disease control. Acta Horticulturae 334:439-453. 1993.
- VENTURA, J.A., ZAMBOLIM, L. & GILBERTSON, R.L. Proposição de nova forma *specialis* em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. Fitopatologia Brasileira 18:280. 1993.