

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM MANCHAS
FOLIARES DE TRIGO E SENSIBILIDADE DE
Drechslera tritici-repentis E *D. siccans* A FUNGICIDAS
*IN VITRO***

ROSANE BALDIGA TONIN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Doutora em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, julho de 2012

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM MANCHAS
FOLIARES DE TRIGO E SENSIBILIDADE DE
Drechslera tritici-repentis E *D. siccans* A FUNGICIDAS
IN VITRO

ROSANE BALDIGA TONIN

Orientador: Prof. Ph.D. Erlei Melo Reis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Doutora em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, julho de 2012

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

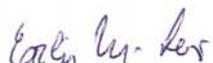
**“Ocorrência de fungos em manchas foliares de trigo e sensibilidade
de *Drechslera tritici-repentis* e *D. siccans* à fungicidas *in vitro*”**

Elaborada por

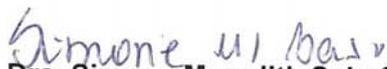
ROSANE FÁTIMA BALDIGA TONIN

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutor em Agronomia – Área de Fitopatologia”

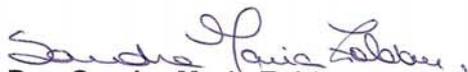
Aprovada em: 20/07/2012
Pela Comissão Examinadora



Dr. Erlei Melo Reis
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador



Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coordenadora PPGAgro



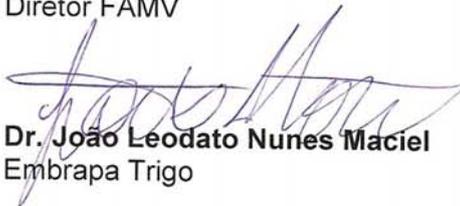
Dra. Sandra Maria Zoldan
OR Sementes



Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV



Dr. Ricardo Trezzi Casa
UDESC



Dr. João Leodato Nunes Maciel
Embrapa Trigo



Dra. Tatiane Dalla Nora
Coodetec

T665o Tonin, Rosane Baldiga
Ocorrência de fungos em manchas foliares de trigo e
sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* e *D. siccansa* a
fungicidas *in vitro* / Rosane Baldiga Tonin. – 2012.
180 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo
Fundo, 2012.
Orientador: Prof. Ph.D. Erlei Melo Reis.

1. Agronomia. 2. Trigo – Cultivo. 3. Cultivos agrícolas. 4.
Fungos na agricultura. I. Reis, Erlei Melo, orientador. II. Título.

CDU: 633.34

Bibliotecária responsável: Fernanda Spíndola - CRB 10/2122

“Sê forte e corajoso; não temas nem te espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo por onde quer que andares” (Js 1:9)

“mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águas, correm e não se cansam, caminham e não se fadigam” (Is 40:31)

Aos meus pais Vasco e Terezinha,
irmãs Rejane e Rosicler, sobrinha
Fernanda, a Monique e meu
esposo Igor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS

Por guiar o meu caminho, pela minha vida e pelas conquistas.....

À família

Aos meus pais Vasco e Terezinha,
irmãs Rejane e Rosicler

pelo amor, compreensão e apoio em todos os momentos;

Ao meu esposo Igor Tonin,

pelo companheirismo, compreensão, carinho e infinito amor....

Ao professor Erlei Melo Reis

Pelo seu apoio, ensinamentos, amizade,
e orientação prestada.

Aos meus colegas e amigos

Aveline Avozani, Andréia Tumelero, Andréia Reis, Anderson Danelli,
Antônio Sérgio Ferreira Filho, Camila Turra, Camila Ranzi, Cristina
Boaretto, Diana Erica Gomes, Elaine Deuner, Eduardo Viana, Felipe
Garcés Fiallos, Fernanda Nicolini, Juliane Câmera, Lilian Cerbaro,
Maria Imaculada Lima, Marília Hoffman, Ricardo Brustolin, Roberto
de Rossi, Sandra Zoldan e Vânia Bianchin, pelas horas de
descontração.

Aos funcionários da UPF

Em especial à Cinara Cardoso e Paulo Tironi pelo auxílio na condução dos experimentos.

À Universidade de Passo Fundo

Pela oportunidade de realizar o curso;

À CAPES e ao PPGAgro pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UPF

pelos ensinamentos e amizade.

A todos

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução dos experimentos.

Obrigada!

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE FIGURAS | xiv |
| RESUMO | 01 |
| ABSTRACT | 03 |
| 1 INTRODUÇÃO | 05 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 08 |
| 2.1 Mancha-amarela em trigo..... | 08 |
| 2.1.1 Ocorrência..... | 08 |
| 2.1.2 Danos..... | 08 |
| 2.1.3 Etiologia..... | 09 |
| 2.1.4 Sintomatologia..... | 10 |
| 2.1.5 Ciclo biológico e epidemiologia..... | 10 |
| 2.1.5.1 Fontes de inóculo, sobrevivência e disseminação... | 10 |
| 2.1.5.2 Germinação, penetração e colonização..... | 11 |
| 2.1.6 Hospedeiros..... | 12 |
| 2.2 Mancha-amarela associada à <i>Drechslera siccans</i> em trigo..... | 12 |
| 2.2.1 Ocorrência..... | 12 |
| 2.2.2 Etiologia..... | 13 |
| 2.2.3 Sintomatologia..... | 13 |
| 2.2.4 Epidemiologia..... | 14 |
| 2.2.5 Fontes de inóculo..... | 14 |
| 2.2.6 Hospedeiros..... | 14 |
| 2.3 Controle da mancha-amarela em trigo..... | 15 |
| 2.4 Resistência de fungos a fungicidas..... | 18 |
| CAPÍTULO I | 24 |
| Etiologia e Quantificação dos agentes causais de manchas foliares na cultura do trigo nas safras 2008 a 2011..... | |
| RESUMO | 24 |
| ABSTRACT | 25 |
| 1 INTRODUÇÃO | 27 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 2.1 Procedimento de identificação dos agentes causais.... | 29 |
| 2.1.2 Isolamento..... | 29 |
| 2.1.3 Avaliação..... | 30 |
| 2.2 Postulados de Koch..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.1 Isolamento monospórico..... | 30 |
| 2.2.2 Multiplicação do inóculo..... | 31 |
| 2.2.3 Inoculação em plantas..... | 32 |
| 2.2.4 Avaliação..... | 33 |
| 2.2.5 Mensuração de conídios..... | 33 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 34 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 47 |
| CAPÍTULO II | 49 |
| Produção de conídios e crescimento miceliano <i>in vitro</i> de <i>Drechslera tritici-repentis</i> em diferentes substratos sólidos..... | |
| RESUMO..... | 49 |
| ABSTRACT..... | 50 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 52 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 53 |
| 2.1 Obtenção do inóculo..... | 53 |
| 2.2 Composição dos meios de cultura para a produção de esporos..... | 54 |
| 2.2.1 Metodologia para a produção de conídios..... | 55 |
| 2.2.2 Avaliação..... | 56 |
| 2.2.3 Diâmetro das colônias..... | 56 |
| 2.2.4 Delineamento experimental..... | 56 |
| 2.3 Metodologia para crescimento miceliano..... | 57 |
| 2.3.1 Avaliação..... | 58 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 58 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 65 |
| CAPÍTULO III | 66 |
| Redução da sensibilidade miceliana de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , isolados do trigo, a fungicidas triazóis, <i>in vitro</i> | |
| RESUMO..... | 66 |
| ABSTRACT..... | 67 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 69 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 71 |
| 2.1 Isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> | 71 |
| 2.2 Fungicidas..... | 72 |
| 2.3 Determinação <i>in vitro</i> da sensibilidade miceliana de <i>Drechslera tritici-repentis</i> fungicidas..... | 73 |
| 2.4 Avaliação..... | 74 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 75 |

| | |
|---|-----|
| 4 CONCLUSÕES | 88 |
| CAPÍTULO IV | 90 |
| Sensibilidade da germinação de esporos de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , a fungicidas IQEs, <i>in vitro</i> | |
| RESUMO | 90 |
| ABSTRACT | 91 |
| 1 INTRODUÇÃO | 93 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 95 |
| 2.1 Isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> | 95 |
| 2.2 Sensibilidade de conídios de <i>Drechslera tritici-repentis</i> a fungicidas, <i>in vitro</i> | 96 |
| 2.3 Avaliação..... | 99 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 99 |
| 4 CONCLUSÕES | 108 |
| CAPÍTULO V | 109 |
| Sensibilidade miceliana de <i>Drechslera siccans</i> , a fungicidas, <i>in vitro</i> | |
| RESUMO | 109 |
| ABSTRACT | 110 |
| 1 INTRODUÇÃO | 112 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 114 |
| 2.1 Isolados de <i>Drechslera siccans</i> | 114 |
| 2.2 Fungicidas..... | 115 |
| 2.3 Determinação <i>in vitro</i> da sensibilidade miceliana a fungicidas..... | 116 |
| 2.4 Avaliação..... | 117 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 118 |
| 4 CONCLUSÕES | 127 |
| REFERÊNCIAS | 128 |
| APÊNDICES | 142 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|--------------------|--|---------------|
| CAPÍTULO I | | |
| 1 | Incidência de fungos associados a manchas foliares em cultivares de trigo na região VCU I, safra 2008..... | 36 |
| 2 | Incidência de fungos associados a manchas foliares em cultivares de trigo na região VCU I, II, III, na safra 2009..... | 37 |
| 3 | Incidência de fungos associados a manchas foliares em cultivares de trigo na região VCU I, II, III, na safra 2010..... | 39 |
| 4 | Incidência de fungos associados a manchas foliares em cultivares de trigo na região VCU I, II, III, na safra 2011..... | 40 |
| 5 | Número de lesões/folha, tamanho de lesões e severidade foliar de isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> em trigo..... | 44 |
| 6 | Número de lesões/folha e tamanho de lesões de isolados de <i>Drechslera siccans</i> em trigo..... | 45 |
| 7 | Valores mínimos, máximos e média do comprimento, largura e número de pseudoseptos de esporos de cinco isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> | 47 |
| CAPÍTULO II | | |
| 1 | Esporulação (esporos/cm ²) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> em sete meios de cultura quando submetidos a duas técnicas de indução da esporulação..... | 61 |
| 2 | Diâmetro miceliano de colônias (mm/placa) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , em sete meios de cultura, | 63 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| | submetidas a duas técnicas de indução da esporulação..... | |
| 3 | Crescimento miceliano (mm/placa) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> em diferentes substratos sólidos e dois regimes luminosos..... | 64 |
| CAPÍTULO III | | |
| 1 | Origem e Identificação dos isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> | 72 |
| 2 | Fungicidas utilizados para determinar a sensibilidade, <i>in vitro</i> , de isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> | 73 |
| 3 | Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI ₅₀) de fungicidas para cinco isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> aos fungicidas IDMs..... | 84 |
| 4 | Fator de Redução da Sensibilidade (FRS) de isolados de trigo de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , a fungicidas IDMs..... | 86 |
| CAPÍTULO IV | | |
| 1 | Identificação dos isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> | 96 |
| 2 | Fungicidas IQE utilizados para determinar a sensibilidade de conídios, <i>in vitro</i> , a cinco isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> | 97 |
| 3 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R ²), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI ₅₀) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , Isolado 01/QTZ..... | 102 |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| 4 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , Isolado 02/ONX..... | 103 |
| 5 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , Isolado 03/HTZ..... | 103 |
| 6 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , Isolado 04/GUA..... | 104 |
| 7 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , Isolado 05/CD..... | 104 |
| 8 | Concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de fungicidas para cinco isolados de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , aos fungicidas IQEs..... | 106 |
| CAPÍTULO V | | |
| 1 | Identificação dos isolados de <i>Drechslera siccans</i> | 115 |
| 2 | Fungicidas utilizados para determinar a sensibilidade, <i>in vitro</i> , de isolados de <i>Drechslera siccans</i> | 116 |
| 3 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de <i>Drechslera siccans</i> , Isolado 01/F30..... | 120 |

| | | |
|---|---|-----|
| 4 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de <i>Drechslera siccans</i> , Isolado 02/RZ..... | 121 |
| 5 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de <i>Drechslera siccans</i> , Isolado 03/SF..... | 121 |
| 6 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de <i>Drechslera siccans</i> , Isolado 04/F52..... | 122 |
| 7 | Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de <i>Drechslera siccans</i> , Isolado 05/VQ..... | 122 |
| 8 | Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de fungicidas para cinco isolados de <i>Drechslera siccans</i> , aos fungicidas IDMs..... | 124 |
| 9 | Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de fungicidas para cinco isolados de <i>Drechslera siccans</i> , aos fungicidas IQEs..... | 126 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|---------------------|--|----|
| Figura | | |
| 1 | Ciclo da mancha-amarela da folha do trigo, causada por <i>Drechslera tritici-repentis</i> e <i>D. siccans</i> | 11 |
| CAPÍTULO III | | |
| 1 | Crescimento miceliano (%) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , isolados de trigo, <i>in vitro</i> , em sete concentrações do fungicida ciproconazol..... | 78 |
| 2 | Crescimento miceliano (%) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , isolados de trigo, <i>in vitro</i> , em sete concentrações do fungicida epoxiconazol..... | 79 |
| 3 | Crescimento miceliano (%) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , isolados de trigo, <i>in vitro</i> , em sete concentrações do fungicida propiconazol..... | 80 |
| 4 | Crescimento miceliano (%) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , isolados de trigo, <i>in vitro</i> , em sete concentrações do fungicida protioconazol..... | 81 |
| 5 | Crescimento miceliano (%) de <i>Drechslera tritici-repentis</i> , isolados de trigo, <i>in vitro</i> , em sete concentrações do fungicida tebuconazol..... | 82 |

OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM MANCHAS FOLIARES DE TRIGO E SENSIBILIDADE DE *Drechslera tritici-repentis* E *D. siccans* A FUNGICIDAS *IN VITRO*

ROSANE BALDIGA TONIN¹ & ERLEI MELO REIS²

RESUMO - A mancha-amarela é de ocorrência mundial e uma das mais importantes doenças foliares do trigo. Considerando a falha de controle químico da mancha-amarela em diversas lavouras brasileiras de trigo nas últimas safras, formulou-se a hipótese de que a ineficiência deste controle poderia ser atribuída à redução da sensibilidade do fungo aos fungicidas utilizados. Objetivou-se com este trabalho estabelecer o perfil da sensibilidade, *in vitro*, de *Drechslera tritici-repentis* e de *siccans*, aos fungicidas triazóis e estrobilurinas. A partir de isolamentos de folhas com sintomas de mancha foliar, provenientes de lavouras de trigo do estado do Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, safra agrícola 2008 a 2011, procedeu-se a identificação, quantificação dos agentes causais e postulados de Koch. Também, substratos e técnicas para a esporulação e crescimento miceliano do patógeno, foram definidos para condução de estudos envolvendo os testes de fungitoxicidade. A sensibilidade miceliana foi determinada *in vitro*, em placas de Petri,

¹Eng. Agr., M. Sc., doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. rosanetonin@yahoo.com.br

²Orientador, Eng. Agr., Ph.D., professor da FAMV/PPGAgro/UPF – erleireis@tpo.com.br

contendo meio de cultura extrato de folhas de trigo suplementado com as concentrações fungicida de 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 20,00 e 40,00 mg/L. Para a determinação da sensibilidade da germinação conidial, o fungicida foi incorporado ao meio ágar-água. A CI_{50} foi determinada para os fungicidas triazóis ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol, protioconazol e tebuconazol e, para as estrobilurinas azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina e, cinco isolados do fungo. Os resultados da porcentagem de inibição do crescimento miceliano e germinação de esporos foram submetidos à análise de regressão logarítmica e calculada a CI_{50} . Conclui-se que: os gêneros *Bipolaris*, *Drechslera* e *Stagonospora* são os principais agentes causais de manchas foliares em trigo, sendo *D.tritici-repentis*, o mais freqüente. No meio de cultura suco V8-ágar, associado à técnica do estresse do micélio, na presença de água, obteve-se maior esporulação de *D. tritici-repentis*; para crescimento miceliano o meio BDA pré-fabricado e extrato de folha de trigo mostraram-se promissores para condução de testes de fungitoxicidade pelo seu baixo custo, características de colônia e praticidade. Os valores da CI_{50} para os triazóis e estrobilurinas foram variáveis e mostraram alteração da sensibilidade para os isolados de *D. tritici-repentis* e de *D.siccans*. A eficácia do controle da mancha-amarela do trigo está relacionada à fungitoxicidade dos triazóis, sendo assim, recomenda-se que os fungicidas do grupo das estrobilurinas não sejam utilizados isoladamente no controle da doença.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L., estrobilurinas, CI_{50} , triazol, resistência.

**OCCURRENCE OF FUNGI IN WHEAT LEAF SPOTS AND
SENSITIVITY *Drechslera tritici-repentis* E *D. siccans*, A
FUNGICIDE *IN VITRO***

ABSTRACT - Leaf yellow spot of wheat has a worldwide occurrence and is one of the most important and common foliar diseases. Control failure of the yellow spot in wheat crop in the last seasons has been reported by growers and farm advisers in Southern Brazil. Thus a hypothesis was formulated that the control failure could be due to the occurrence of fungi sensitivity reduction to fungicides. The objective of this work was to establish the *in vitro* sensitivity profile for *Drechslera tritici-repentis* and *D. siccans*, to triazole (DMI) and strobilurin fungicides (QoI). The two fungi were isolated from wheat leaves with symptoms collected in farms in the states of Parana, Santa Catarina, Minas Gerais, and Rio Grande do Sul, from 2008 to 2011 growing seasons. The fungal identification, quantification, and Koch's postulates were performed for *D. tritici-repentis* and *D. siccans* isolates. Also, substrates and techniques for mycelial growth and fungal sporulation were conducted for the future fungitoxicity tests. The mycelial sensitivity was determined *in vitro*, in Petri dishes containing wheat leaf extract-agar supplemented with fungicidal at concentrations of 0.00, 0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 20, 00 and 40.00 mg/L water. To determine the sensitivity of conidia germination, the fungicides were incorporated into water-agar. The IC₅₀ was determined for DMI fungicides cyproconazole, epoxiconazole, propiconazole, prothioconazole and tebuconazole triazole and for QoI azoxystrobin, kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin and trifloxystrobin, for five isolates of each pathogen. Percent inhibition

data of mycelium growth and spore germination were analyzed by logarithmic regression and the IC_{50} calculated. It was concluded that the genera *Bipolaris*, *Drechslera* and *Stagonospora* were the main causal agents of leaf spot in wheat, and *D. tritici-repentis*, the most frequent. In V8 juice agar, associated with the mycelial stress technique in the presence of water, was obtained the highest sporulation of *D. tritici-repentis*, and mycelial growth on dehydrated PDA, and wheat extract agar were the best. The IC_{50} values for the DMI and QoI were variable and showed shift in sensitivity to *D. tritici-repentis* and *D. siccans* isolates. The control efficacy of wheat yellow spot is related to the triazoles fungitoxicity, so it is recommended that the strobilurin fungicides of the group not used alone to control the disease.

Keywords: *Triticum aestivum*, strobilurins, IC_{50} , triazole, resistance.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma cultura importante para a alimentação da população do Brasil e do mundo. O Brasil não é auto-suficiente na produção, ainda importa grande quantidade do cereal. Globalmente, o trigo é a segunda cultura dentre as espécies vegetais em produção, sendo superada apenas pelo milho.

A produção nacional de trigo na safra 2011/12 foi de 5.788 milhões de toneladas, com rendimento médio de 2.672 Kg/ha e o consumo deste cereal de 11 milhões de toneladas. A área cultivada foi de 2.166,2 mil hectares, distribuídos nas regiões centro-oeste, sul e sudeste (CONAB, 2012).

Atualmente, o trigo é cultivado nos estados da região sul do país, representando 94,6% da área cultivada. Desta área, 47,4% estão no estado do Rio Grande do Sul e 43,2% no Paraná (CONAB, 2012).

Os dados acima mostram a necessidade de expansão da área cultivada e o aumento da produtividade. Uma das limitações à elevação da produção deve-se, principalmente, às condições climáticas relacionadas à precipitação pluvial e temperatura que, pela ocorrência de chuvas freqüentes e altas temperaturas, contribuem para o ataque severo de doenças na cultura (REIS et al., 2001a).

As doenças de maior importância, pelos danos que podem causar na cultura do trigo no Brasil, são oídio, causado por *Oidium monilioides* (Nees) Link (teleomorfo *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Dc.) E.O. Speer), a ferrugem da folha, *Puccinia triticina* Rob. ex. Desm, a mancha da gluma causada por *Stagonospora nodorum*

(Berk.) Cast. & Germ. (teleomorfo *Phaeosphaeria nodorum*), a mancha marrom causada por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In. Sorok) Shoem. (teleomorfo *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib) Dreschs. Ex Dastur.), a mancha-amarela causada por *Drechslera tritici-repentis* Died. Shoemaker (teleomorfo *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. e a giberela, causada por *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zaeae* (Schw.) Petch) (PICININI & FERNANDES, 2003).

A mancha-amarela da folha do trigo é considerada a principal mancha foliar na região sul do Brasil, pela sua ampla disseminação e danos causados. O manejo da mancha-amarela é feito por meio de práticas integradas, como utilização de cultivar resistente ou tolerante, produção de sementes sadias, tratamento de sementes com fungicida, semeadura na época indicada, rotação de culturas e aplicação de fungicidas (REIS & CASA, 2007). A resistência genética é uma medida de controle muito importante, porém, no Brasil ainda não se dispõe de cultivares com resistência suficiente para controlar a mancha-amarela do trigo (REUNIÃO, 2011).

O uso de fungicidas é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, porém, seu uso sucessivo pode promover a seleção de linhagens de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida (GHINI & KIMATI, 2000).

Atualmente, a resistência de fungos vem sendo um dos maiores problemas do controle químico das doenças de plantas.

Estudos da resistência de fungos a fungicidas são justificados pelo amplo uso desses produtos nos sistemas agrícolas, pela grande diversidade de grupos químicos e pela introdução de

novos produtos, dessa forma os trabalhos que venham a fortalecer o conhecimento da sensibilidade de populações fúngicas diante do tratamento químico, são de grande importância (AZEVEDO, 2007).

A fungitoxicidade de uma determinada substância química é quantificada pela DE₅₀ (dose efetiva), ou CE₅₀ (concentração efetiva), ou CI₅₀ (concentração inibitória), e se refere à concentração do ingrediente ativo que inibe 50% do crescimento miceliano ou da germinação de esporos (SHARVELLE, 1961; EDGINGTON et al., 1971; REIS et al., 2010).

Sendo assim, o monitoramento da sensibilidade a fungicidas, de uma população do fungo alvo é importante para determinar a presença de isolados resistentes.

Dentro deste contexto, após relatos de dificuldade no controle químico de manchas foliares em trigo nas últimas safras na região sul do Brasil, onde se observou baixa eficiência de controle, mesmo após sucessivas aplicações de fungicidas, levantou-se a possibilidade de ocorrência da redução de sensibilidade do fungo, agente causal da mancha-amarela do trigo, aos fungicidas. Com esse objetivo conduziu-se um estudo, *in vitro*, visando testar a sensibilidade de isolados *D. tritici-repentis* e de *D. siccas* a fungicidas triazóis e estrobilurinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mancha-amarela em trigo

2.1.1 Ocorrência da doença

A mancha-amarela da folha de trigo é de ocorrência mundial e encontra-se distribuída em mais de 21 países (MEHTA, 1993). Foi relatada como doença importante na Austrália (REES & PLATZ, 1979), no Canadá (WRIGHT & SUTTON, 1990) e nos Estados Unidos (HOSFORD, 1982).

No Brasil, a primeira referência sobre o agente causal foi feita por Costa Neto (1967), relatando a ocorrência no Rio Grande do Sul, em 1959. Mehta (1993) relatou ocorrência de epidemia da doença, no estado do Paraná em 1973. O fungo foi encontrado em sementes no Brasil em 1976 (LUZ & LUZZARDI, 1976). A partir do ano de 1979, a doença aumentou de intensidade e atualmente é uma das doenças foliares mais frequentes em trigo (MEHTA, 1993).

2.1.2 Danos

Na Austrália, Rees & Platz (1983) relatam danos devido à doença de 13 a 48 %, sendo grande parte da redução da produtividade devido à redução do tamanho dos grãos.

O dano causado pelas manchas foliares em trigo pode ser estimado pela função normalizada $R = 1.000 - 5,7 I$ (R= rendimento de grãos e I = incidência foliar da doença) (REUNIÃO, 2011).

2.1.3 Etiologia

O agente causal da mancha-amarela apresenta em seu ciclo biológico, tanto a forma anamórfica como a teleomórfica. Na forma anamórfica (imperfeita ou assexuada), o fungo pertence ao gênero e espécie *Drechslera tritici-repentis* (Died) Shoemaker, sinônimos *Helminthosporium tritici-repentis* Diedicke, *D. tritici-vulgaris* (Nisikado) Ito e *H. tritici-vulgaris* (Nisikado). A forma perfeita ou teleomórfica corresponde a *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (sinônimo *P. trichostoma* (Fr.) Fckl.) (WIESE, 1987).

De acordo com Wiese (1987), os conidióforos do fungo são simples ou agrupados de 2-3, emergidos através dos estômatos ou entre as células epidérmicas, eretos ou flexuosos, algumas vezes geniculados, cilíndricos ou ligeiramente afilados, frequentemente dilatados na base, medindo 7-8 x 100-300 µm ou 6-12 x 250-400 µm (ELLIS, 1971). Conídios solitários, cilíndricos, retos ou ligeiramente curvados, arredondados no ápice e a base caracteriza-se por possuir forma cônica, conhecida como cabeça de cobra, sub-hialinos a ligeira coloração palha, parede delgada, 12-21 x 45-200 µm, 4 a 7 pseudoseptos segundo Wiese (1987) ou 14-20 (17,7) x 80-250 (117) µm e 1-9 pseudoseptos (ELLIS, 1971).

Na forma teleomórfica é encontrado sobre os restos culturais do trigo. Os pseudotécios são negros, com setas longas, diâmetro entre 200-350 µm e algumas vezes rostrados. Os ascósporos são ovais a globosos, pardo-amarelados, medindo 18- 28 x 45-70 µm. Apresentam três septos transversais com leve constrição nos septos.

As células medianas apresentam 1 a 2 septos longitudinais (WIESE, 1977).

2.1.4 Sintomatologia

Os sintomas mais comuns da doença são observados nas folhas e bainhas. Os sintomas inicialmente se caracterizam por pequenas manchas cloróticas, 24-48 h após a inoculação. Com o passar do tempo, a área de tecido amarelecido aumenta surgindo uma região central necrosada, de cor parda. Tanto a borda de tecido amarelecido como o centro morto, aumentam em área, em função do tempo. Estas lesões são elípticas em forma, podendo atingir 12 mm de comprimento (LAMARI & BERNIER, 1989; REIS et al., 1996).

2.1.5 Ciclo biológico e epidemiologia

2.1.5.1 Fontes de inóculo, sobrevivência e disseminação

O fungo *D. tritici-repentis* é um patógeno necrotrófico apresentando uma fase parasitária sobre a planta hospedeira e outra, saprofítica sobre os restos culturais (Fig. 1). O patógeno pode sobreviver em sementes, restos culturais e em outros hospedeiros (REIS et al., 2011) A remoção e disseminação dos ascósporos e conídios de *D. tritici-repentis* dos órgãos infectados ocorre principalmente pelo vento e respingos de chuva a curtas distâncias (REIS et al., 2001a).

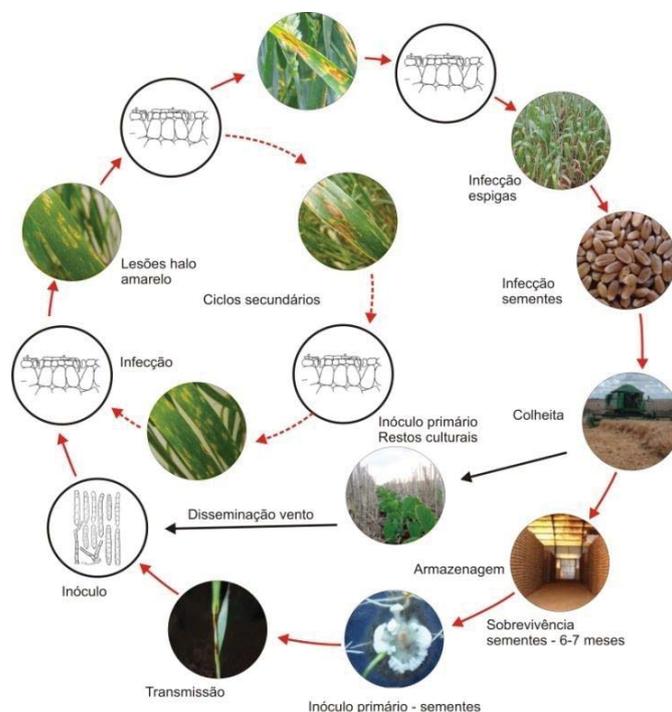


Figura 1. Ciclo da mancha-amarela da folha do trigo causada por *Drechslera tritici-repentis* e *D. siccans* (REIS & DANELLI, 2009).

2.1.5.2 Germinação, penetração e colonização

Conídios e ascósporos são infectivos ao trigo e, ao atingirem a superfície verde da planta, necessitam de água líquida para iniciar o processo de germinação. O processo de infecção inicia com a germinação do conídio, seguido pelo alongamento do tubo germinativo e formação do apressório. Durante a colonização o micélio invade as células extraindo nutrientes determinando-lhes a morte pela ação parasitária e, também, pela produção de toxinas. A temperatura ótima para o desenvolvimento da doença está entre 18 e

28 °C e, para a infecção, 30 horas de molhamento (REIS et al., 2001a; REIS et al., 2011).

2.1.6 Hospedeiros

Como hospedeiros do fungo, entre as espécies cultivadas, cita-se o trigo, centeio e o triticale (HOSFORD, 1982). O trigo é o hospedeiro mais importante, porém existe uma ampla gama de hospedeiros secundários (REIS et al., 2011).

2.2 Mancha-amarela associada à *Drechslera siccans* em trigo

2.2.1 Ocorrência da doença

Na safra 2008 registrou-se uma epidemia de manchas foliares em trigo no RS, PR e SC. Fato relevante, constatado nesta safra através de trabalhos conduzidos na Universidade de Passo Fundo, foi à constatação da presença de uma nova espécie de *Drechslera*, em amostras foliares de trigo analisadas. A nova espécie *Drechslera siccans* é agente causal de mancha-amarela da folha do trigo. Nesta safra foi determinada pela primeira vez sua ocorrência em trigo no Brasil (TONIN & REIS, 2009). A espécie em estudo foi identificada por especialistas da Universidade de La Plata, Argentina.

2.2.2 Etiologia

O agente causal da mancha-amarela apresenta no campo, em seu ciclo biológico, tanto a forma anamórfica como a teleomórfica. A forma perfeita de *D. siccans* (Drechsler) Shoem. (anamorfo) (Sin. *Helminthosporium siccans* Drechsler) é *Pyrenophora lolii* Dovaston. O fungo apresenta na sua forma anamórfica conidióforos com conídios. Conidióforos solitários ou ocasionalmente em pequenos grupos, mais ou menos retos. Algumas vezes geniculados próximos ao ápice, cor parda, até 400 µm de comprimento e de 7 - 11 µm de espessura, dilatados na base a 19-25µ; septados, não ramificados, cicatrizes proeminentes e freqüentemente próximas. Conídios normalmente retos, cilíndricos ou pouco afilados em direção a base ou no ápice, pálidos, cor palha clara, ou marrom oliváceo, 3 - 11 (a maioria 4 - 6) pseudoseptos, 30 - 170 (normalmente 60 - 100) µm de comprimento x 14 - 22 (a maioria 16 - 18) µm de largura; hilo 5 - 8 µm de largura (SHOEMAKER, 1959; ELLIS, 1971).

2.2.3 Sintomatologia

Os sintomas causados por *D. siccans*, em trigo, são semelhantes aos de *D. tritici-repentis*, manchas cloróticas nas folhas que, com o passar do tempo, expandem-se e apresentam a região central necrosada, de cor parda. Estas lesões são elípticas e circundadas por halo amarelo.

A visualização dos sinais é fundamental à diagnose. Com base sintomatológica é difícil a diagnose entre a mancha-amarela

causada por *D. siccans* e *D. tritici-repentis*. A diagnose segura do agente causal deve ser feita com base nos sinais.

2.2.4 Epidemiologia

D. siccans, agente causal da mancha-amarela da folha do trigo ocorre praticamente o ano inteiro em áreas onde o azevém encontra-se perenizado. Os conídios são formados em uma faixa de temperaturas entre 3 a 27 °C. No entanto, para que a infecção ocorra é necessário a presença de uma película de água na superfície dos órgãos suscetíveis (SMILEY et al., 2005).

2.2.5 Fontes de inóculo

O patógeno causador da mancha amarela do trigo, *D. siccans*, é introduzido na lavoura através do uso de sementes infectadas, forma pela qual o patógeno é levado a longas distâncias. Sua sobrevivência pode ser garantida nos resíduos culturais pela produção de pseudotécios ou conídios. Assim, a semente infectada, presença de restos culturais infectados (trigo, azevém e aveia) e plantas de azevém (hospedeiro principal), serão as principais fontes de inóculo primário para o próximo cultivo.

2.2.6 Hospedeiros

O fungo *D. siccans* afeta preferencialmente azevém (*Lolium multiflorum* L.) e (*L. perene*). Na literatura, também outros

tipos de gramíneas são relatadas como hospedeiras, dentre elas aveia (*Avena sativa*), capim-lanudo (*Holcus lanatus*), cevada (*Hordeum vulgare*), grama-azul (*Poa pratensis*), bromo-cevada (*Bromus molli*), capim-cevadinha (*B. inermis*), cevadilha (*B. unioloides*), pé-de-galo (*Dactylis glomerata*), erva-carneira (*Festuca pratensis*), festuca-alta (*F. arundinacea*), festuca-vermelha-das-dunas (*F. rubra*), erva-de-conta (*Arrhenatherum elatius*), rabo-de-gato (*Phleum pratense*), aveia-amarela (*Trisetum flavescens*) e trigo (*Triticum aestivum*) (SHOEMAKER, 1962; AMMON, 1963; LATCH, 1966; MÄKELÄ, 1971; ELLIS, 1971).

2.3 Controle da mancha-amarela em trigo

As estratégias de controle visam, principalmente, a redução do inóculo, erradicando ou diminuindo sua densidade a nível inferior ao limiar numérico de infecção (REIS et al., 2011). No controle da mancha-amarela preconiza-se a adoção de práticas integradas como cultivar resistente ou tolerante, semente sadia, tratamento de semente com fungicida, semeadura na época indicada, rotação de culturas e aplicação de fungicidas nos órgãos aéreos (REIS & CASA, 2007).

Os fungos *D. tritici-repentis* e *D. siccans*, são parasitas necrotróficos e sobrevivem em sementes e saprofiticamente nos restos culturais dos hospedeiros, sendo a rotação de culturas uma prática eficaz no controle do patógeno.

A prática da rotação de culturas consiste no cultivo alternado de espécies vegetais diferentes no mesmo local e na mesma

estação anual. O princípio do controle envolvendo a rotação de culturas baseia-se na supressão ou eliminação do substrato apropriado para o patógeno, na fase saprofítica. A ausência da planta cultivada anualmente leva à erradicação total ou parcial dos patógenos necrotróficos que dela são dependentes (REIS & FORCELINI, 1995). A manutenção de restos culturais na superfície do solo, como no plantio direto, prolonga a viabilidade do fungo e sua permanência na lavoura.

De acordo com Reis et al. (2011), através da rotação de culturas se pode erradicar *D. tritici-repentis* de uma área. As espécies vegetais, não hospedeiras, indicadas no sistema de rotação, no inverno, incluem as aveias e espécies de folhas largas tais como ervilhaca, chícharo, nabo forrageiro, colza, linho, serradela, trevos, etc. (SANTOS et al., 1987). A prática da rotação de culturas por um ou dois anos sem trigo reduz a incidência de manchas foliares em trigo (PRESTES et al., 2002).

O uso de variedades resistentes é uma medida de controle muito importante, no entanto, no Brasil ainda não existem cultivares com resistência suficiente para controlar a mancha-amarela do trigo (REUNIÃO, 2011).

O controle químico da mancha-amarela é obtido por meio do tratamento de sementes ou pela aplicação de fungicidas na parte aérea, com os fungicidas dos grupos químicos triazóis e estrobilurinas ou suas misturas. O efeito benéfico do tratamento de sementes, visando ao controle da transmissão de fungos que causam manchas foliares, ocorre nas lavouras com rotação de culturas de inverno.

Para o tratamento de sementes, recomenda-se a utilização de iprodiona 50 g de i.a. ou difenoconazol 30 g de i.a. para 100 Kg de sementes (REIS & CASA, 2009), que, conforme PICININI & FERNANDES (2003), associado a outras estratégias de controle, podem reduzir o número de aplicações de fungicidas no controle de doenças foliares em trigo.

Os fungicidas recomendados para o controle de manchas foliares em trigo pertencem ao grupo dos triazóis (ciproconazol, epoxiconazol, metconazol, propiconazol e tebuconazol) e estrobilurinas (azoxistrobina, cresoxim-metílico, piraclostrobina e trifloxistrobina (REUNIÃO, 2011). Em trabalho realizado por Santana et al. (2010) com o objetivo de avaliar a eficiência do controle da mancha-amarela na safra 2010 comparou-se as misturas epoxiconazol + piraclostrobina, tebuconazol + trifloxistrobina e ciproconazol + azoxistrobina. Os resultados mostraram que a mistura epoxiconazol + piraclostrobina apresentou melhor controle da doença, quando comparado com as demais.

Conforme Reunião (2011), a associação do uso de sementes sadias, do tratamento de sementes com fungicidas e doses eficientes e da rotação de culturas, reduz o inóculo primário de fungos causadores de manchas foliares. A aplicação de fungicidas na parte aérea deve ser feita com base no LDE, sendo calculado com base na função de dano $R = 1000 - 5,7 I$ (R = rendimento de grãos e I = incidência foliar da doença).

De acordo com informações de técnicos, pesquisadores e produtores, tem se questionado a eficiência do controle químico da

mancha-amarela. Mesmo com várias aplicações de fungicidas o controle não tem sido satisfatório.

2.4. Resistência de fungos a fungicidas: Redução da sensibilidade

Os fungicidas têm sido empregados, por cerca de 200 anos, para proteger as plantas de doenças provocadas por ataques de fungos (BRENT, 1995). Porém, não se constituem na única medida de controle de doenças de plantas têm-se, ainda, o melhoramento genético, as práticas culturais, o controle biológico, etc.

Zambolim et al. (2007) abordam que para muitas doenças, o controle químico tem sido, a única medida viável a curto prazo, sem o qual inúmeras espécies de plantas teriam seus rendimentos reduzidos drasticamente, acarretando prejuízos para os produtores e para o país. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos em diversas culturas (GHINI & KIMATI, 2000).

Fungicidas são substâncias químicas de origem natural ou sintética que, aplicadas às plantas protegem-nas da penetração e/ou posterior desenvolvimento de fungos patogênicos, em seus tecidos. Por definição, fungicidas são substâncias químicas que matam fungos (do latim *fungus* significa fungo e *caedo* significa matar), contudo uma substância química para ser fungicida não necessariamente deve matar o fungo. Algumas controlam doenças inibindo o crescimento micelial ou a esporulação, denominadas de substâncias fungistáticas e antiesporulantes, e há também substâncias que não agem diretamente sobre o agente causal, mas que atuam no sistema de autodefesa da

planta, como exemplo o acibenzolar metílico e o fosetil alumínio (REIS et al., 2010).

Os fungicidas, de acordo com o seu modo de ação, podem ser classificados em sistêmicos e não sistêmicos. Alguns fungicidas atuam controlando ampla gama de doenças fúngicas e são denominados de fungicidas não específicos, os quais não são absorvidos e translocados dentro da planta, como os protetores e os de contato. Por outro lado, outros produtos apresentam espectro limitado de atividade contra um ou dois grupos específicos de fitopatógenos e são conhecidos como fungicidas com modo de ação específico, os quais são absorvidos pelas raízes e folhas, translocados pelo sistema condutor da planta principalmente xilema (REIS et al., 2001b; RODRIGUES et al., 2007; ZAMBOLIM et al., 2007).

Os fungicidas mesostêmicos de ação translaminar, como as estrobilurinas, também possuem ação específica sobre o patógeno (ZAMBOLIM et al., 2007). A especificidade dos fungicidas, principalmente dos sistêmicos, faz com que haja alto risco de resistência adquirida pelo patógeno (RODRIGUES et al., 2007; ZAMBOLIM et al., 2007).

Com o surgimento dos fungicidas sistêmicos no final da década de 1960, a incidência da redução da sensibilidade aumentou grandemente em condições de campo. Os primeiros casos de resistência de fungos a fungicidas foram detectados com o produto bifenil, um hidrocarboneto aromático usado desde 1959 para o controle de *Penicillium* em tratamento pós-colheita em citros (OGAWA, 1976).

Vários casos de resistência ocorreram após o lançamento

de fungicidas sistêmicos no mercado. Antes, com os produtos protetores ou convencionais, o problema não ocorria, pois eles atuam em inúmeros pontos do metabolismo do fungo. Já os sistêmicos atuam em poucos processos metabólicos vitais, permitindo o desenvolvimento de linhagens resistentes (GHINI & KIMATI, 2000).

No Brasil, os primeiros casos relatados surgiram em 1974 e aumentaram rapidamente nas décadas seguintes em sua maioria associadas ao benomil. Nas décadas seguintes relatos associados a este fungicida aumentaram (GHINI & KIMATI, 2000). Reis et al. (2010) cita que a maior parte dos casos de redução de sensibilidade surgiu após a introdução dos grupos químicos benzimidazol, fenilamida, carboxanilida, dicarboximida, aminopirimidina e inibidores da desmetilação (IDM).

O principal motivo para o elevado risco de resistência de 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).

A resistência é definida como um ajuste estável e hereditário de um fungo a um fungicida, resultando em redução na sensibilidade do patógeno (EUROPEAN, 1988). Já Russel (2003) descreve o termo resistência como à habilidade de um patógeno “resistir” à ação de químicos utilizados para seu controle. Ghini & Kimati (2000) definem o termo sensibilidade como o oposto de resistência, quando descrevem que fungos resistentes a fungicidas apresentam uma redução na sensibilidade.

A resistência cruzada refere-se à resistência de um fungo a dois ou mais fungicidas com o mesmo mecanismo de ação ou

similaridade química, conferida pelo mesmo fator genético. Ocorre por exemplo com a aplicação contínua de fungicidas que atuam na mitose em fungos. Já a resistência múltipla é definida como à resistência a dois ou mais fungicidas conferida por diferentes fatores genéticos, implicando que os fungicidas têm modo de ação diferentes (ZAMBOLIM et al., 2007).

A resistência é chamada de qualitativa ou oligogênica, se ocorre abruptamente pela modificação de um único gene do patógeno e resulta em ineficácia do fungicida, mesmo em doses mais altas que a normal. É governada por um conjunto de genes dominantes e pode ser quebrada quando fungicidas com modo de ação específico são empregados no campo. Ex: estrobilurinas. A resistência quantitativa ou multigênica é assim chamada, quando decorre da interação de vários genes menores e se caracteriza por redução gradativa da eficácia, eventualmente recuperada pelo uso de doses mais elevadas. É governada por um conjunto de genes com efeitos menores e relaciona-se mais com fungicidas com risco moderado. Ex: triazóis e benzimidazóis (FORCELINI et al., 2001; McGRATH, 2001; ZAMBOLIM et al., 2007).

A fungitoxicidade da substância química é medida por parâmetros como a DE_{50} (dose efetiva ou eficaz que promove um efeito desejado em 50% dos microrganismos submetidos ao teste), DL_{50} (dose letal), CL_{50} (concentração letal), CI_{50} (concentração inibitória), CE_{50} (concentração efetiva), CMI (Concentração Mínima Inibitória), IC_{50} (inibição do crescimento) e CI_{50} (concentração inibitória que inibe em 50% o crescimento miceliano ou a germinação

de esporos) (SHARVELLE, 1961; TORGESON, 1967; EDGINTON, et al., 1971; RUSSEL, 2004; SILVA et al., 2006; REIS et al., 2010).

O monitoramento da sensibilidade a fungicidas em uma população de patógenos é importante para determinar a presença de isolados resistentes. Este monitoramento é necessário especialmente para fungicidas com atividade sistêmica, que apresentam um modo de ação específica, isto é, atuam sobre um único sítio do metabolismo do fungo (KIMATI, 1995; GHINI & KIMATI, 2000).

Edgington et al. (1971) classificaram a sensibilidade de fungos a fungicidas seguindo o seguinte critério: insensíveis se a $DE_{50} \geq 50$ mg/L; moderadamente sensíveis se a DE_{50} estiver entre 1 e 10 mg/L; altamente sensíveis se a $DE_{50} < 1$ mg/L, sendo DE_{50} definido como a concentração do ingrediente ativo capaz de inibir em 50% do crescimento miceliano ou da germinação de esporos do isolado.

A redução da sensibilidade (RS) de uma linhagem de um fungo pode ser medida pelo fator de sensibilidade (FS). O FS corresponde a: $FS = (DL_{50} \text{ da linhagem suspeita} / DL_{50} \text{ da linhagem sensível})$. Se o FS for 1,0 a sensibilidade está sem alteração e sendo maior que 1 indica que está havendo redução na sensibilidade (RUSSEL, 2004; REIS et al., 2010).

Valores de CI_{50} de referência (linha de base da sensibilidade) mais confiáveis são aqueles determinados para estirpes que ocorriam antes de um fungicida em particular ser usado.

Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento de isolado não sensível como produto aplicado, intensidade de uso e características do organismo (ZAMBOLIM et al., 2007). A aplicação de fungicida pode ser manipulada em função de estratégias anti-

resistência. Estas estratégias são baseadas no princípio de que quando há aplicação do fungicida, também é exercida uma pressão de seleção sobre a população do patógeno, podendo, a longo ou curto prazo, dependendo da resistência genética envolvida, resultar na seleção e predominância de indivíduos não sensíveis na população do fungo alvo (GHINI & KIMATI, 2000).

Comumente a falha no controle químico de uma determinada doença é atribuída ao fato de que, um determinado fungicida ficou "fraco", atribuindo-se ao produto químico, geralmente a causa do insucesso no controle da doença (ZAMBOLIM et al., 2007). Porém, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida anteriormente eficaz, colocando em risco a eficiência do método. Assim, o surgimento de fungos fitopatogênicos resistentes a fungicidas é um sério problema que pode por em risco o controle químico (GHINI & KIMATI, 2000).

CAPÍTULO I

ETIOLOGIA E QUANTIFICAÇÃO DOS AGENTES CAUSAIS DE MANCHAS FOLIARES NA CULTURA DO TRIGO NAS SAFRAS 2008 A 2011

ROSANE BALDIGA TONIN¹ & ERLEI MELO REIS²

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo identificar os fungos fitopatogênicos associados a sintomas de manchas foliares em amostras de trigo procedentes de lavouras de várias regiões tritícolas. Foram analisadas dezesseis amostras do ano de 2008, setenta e seis do ano de 2009, trinta e seis do ano de 2010 e trinta e quatro do ano de 2011, oriundas dos Estados do Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Discos foliares assépticos foram distribuídos em gerboxes, constituindo uma câmara úmida e, incubados por oito dias, em câmara de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Foram preparadas suspensões de esporos de *Drechslera tritici-repentis* e de micélio de *D. siccans* e inoculadas em plantas de trigo do cultivar Mirante. Mensurações de conídios de *D. tritici-repentis* também foram realizados. Constatou-se a ocorrência de *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*, *D. siccans* e

¹Eng. Agr., M. Sc., doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. rosanetonin@yahoo.com.br

²Orientador, Eng. Agr., Ph.D., professor da FAMV/PPGAgro/UPF - erleireis@tpo.com.br

Stagonospora nodorum associados às lesões foliares em trigo. Verificou-se na safra 2008, a predominância de *D. siccans* com incidência de 0 a 75 % nas amostras avaliadas, sendo o primeiro relato desta espécie, em trigo, no Brasil. Nas safras 2009, 2010 e 2011, houve a predominância de *D. tritici-repentis*. Os sintomas confirmaram a patogenicidade dos agentes causais em trigo. As mensurações dos conídios de *D. tritici-repentis* apresentaram valores de comprimento, largura e número de pseudoseptos semelhantes às descrições na literatura.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, *Drechslera*, *Bipolaris*, *Stagonospora*, ocorrência.

ETIOLOGY AND QUANTIFICATION OF CAUSAL AGENTS OF WHEAT LEAF SPOTS IN 2008 TO 2011 GROWING SEASONS

ABSTRACT - This study aimed to identify and quantify pathogenic fungi associated with leaf spot symptoms in wheat leaves samples taken from different wheat regions. Sixteen samples were analyzed in 2008, seventy-six in 2009, thirty five in 2010 and thirty four in 2011. Samples were taken from wheat fields in the states of Parana, Santa Catarina, Minas Gerais and Rio Grande do Sul. Leaf discs cut from the lesions border were incubated in acrylic boxes, providing a moist chamber and incubated for eight days in a growth chamber at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 12 h photoperiod. Spores suspensions were prepared for *Drechslera tritici-repentis* and mycelium for *D. siccans* and inoculated

in wheat cultivar Mirante. Conidia measurements of *D. tritici-repentis* were also conducted. It was identified *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*, *D. siccans* and *Stagonospora nodorum* associated with wheat leaf lesions. *D. siccans* was the predominant fungus in 2008, isolated from zero to 75% in the samples. This was the first report of *D. siccans* on wheat in Brazil. In the 2009, 2010 and 2011, there was a predominance of *D. tritici-repentis*. The characteristic symptoms of the causal agents were confirmed by the pathogenicity in wheat. Measurements of conidia of *D. tritici-repentis* showed values of length, width and number of pseudoseptos similar to the descriptions in the literature.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Drechslera*, *Bipolaris*, *Stagonospora*, occurrence.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) ocupa papel de destaque dentre os cereais produzidos no Brasil, tendo uma importante função econômica e social. Apesar dessa importância, seu potencial não tem sido explorado devidamente (ARRUDA et al., 2005). Uma das limitações encontradas pelos produtores para produzir trigo, na região sul do Brasil, é o excesso de chuva e o acúmulo de dias encobertos, favoráveis à ocorrência e ao aumento da intensidade das doenças (REIS et al., 2001a).

Devido às condições ambientais adversas, aliadas à suscetibilidade das cultivares e dependendo das práticas culturais, o trigo pode ter seu rendimento prejudicado pelo ataque de doenças causadas por fungos. Os prejuízos no rendimento e na qualidade dos grãos são maiores quando várias doenças ocorrem simultaneamente na lavoura, entre estas destacam-se as que incidem na parte aérea da cultura, como a ferrugem, o oídio e as manchas foliares (REUNIÃO, 2005).

Os danos causados pelas doenças foliares são atribuídos principalmente à redução da atividade fotossintética da planta (BOHATCHUK et al., 2008). O oídio [*Blumeria* (Sin. *Erysiphe*) *graminis* Speer f.sp. *tritici* Marchal], a ferrugem da folha (*Puccinia triticina* Eriks), a mancha amarela (*Drechslera tritici-repentis* (Died) Drechs.), a mancha marrom (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.) e a septoriose (*Stagonospora nodorum* (Berk.) Berk.), são as principais doenças foliares na Região Sul do Brasil (CSBPT, 2006; REIS & CASA, 2005).

Dentre as manchas foliares do trigo no Sul do Brasil, a mancha-amarela, a mancha-marrom e a septoriose, estão entre as principais. Os agentes causais formam lesões necróticas com halo clorótico nas folhas e possuem capacidade de sobreviver na semente e restos culturais. As manchas foliares ocorrem e têm maior intensidade quando são utilizadas sementes infectadas ou quando o trigo é cultivado sob monocultura em sistema de plantio direto (REIS et al., 1998; ZAMBOLIM et al., 2000). Condições ambientais, agressividade dos patógenos, cultivar suscetível e época do início da infecção também interferem na ocorrência de epidemias (MEHTA, 1993).

A redução na produtividade pode atingir até 80% para mancha marrom (MEHTA, 1993), até 48% para mancha amarela (REES & PLATZ, 1983) e até 31% para septoriose (CASA et al., 2001). Balardin (2001), verificou redução na produtividade de 49,36% devido à incidência destas manchas foliares.

O presente trabalho teve como objetivo identificar e quantificar os fungos fitopatogênicos associados a sintomas de manchas foliares em amostras de trigo procedentes de lavouras de várias regiões nos anos de 2008 a 2011.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia-Micologia e em câmara de crescimento vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo-RS.

2.1 Procedimento de identificação dos agentes causais

Amostras de folhas de trigo com sintomas de manchas foliares, provenientes de lavouras de trigo do estado do Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, foram analisadas nos anos de 2008, 2009, 2010 e 2011, sendo dezesseis amostras do ano de 2008, setenta e seis do ano de 2009, trinta e seis do ano de 2010 e trinta e quatro do ano de 2011.

2.1.2 Isolamento

Para o isolamento foram cortados discos foliares de 9,0 mm de diâmetro e feita à assepsia. A assepsia dos discos foliares foi realizada através da imersão em solução de álcool 99%, lavando-os ligeiramente em água destilada e, em seguida, transferidos para uma solução aquosa de hipoclorito de sódio 1%, por três minutos e, novamente lavados com água destilada. Posteriormente, 25 discos/amostra foram distribuídos em caixas de acrílico, tipo gerbox de poliestireno cristal (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo no fundo do recipiente uma espuma de nylon e duas folhas sobrepostas de papel filtro, saturadas com água destilada e esterilizada, formando uma câmara úmida.

A incubação foi conduzida em ambiente controlado, câmara de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas proporcionadas três lâmpadas fluorescentes OSRAM Universal, 40 watts de potência, localizadas a 50 cm acima dos gerboxes.

2.1.3 Avaliação

Após um período de incubação de oito dias, foi realizada a avaliação, com auxílio de microscópio estereoscópico, avaliando-se a incidência e a identificação dos fungos presentes nos discos foliares. Por incidência entende-se o número de unidades de plantas ou de órgãos amostrados que estavam doentes, expresso em percentagem ou proporção, do número total de unidades avaliadas (CASA et al., 2009).

Após a quantificação através da observação das estruturas do fungo presentes no tecido vegetal, retirou-se, com o auxílio de uma agulha histológica, fragmentos das lesões contendo estruturas do patógeno e transferidos para placas de Petri contendo meio semi-seletivo de Reis (1983), para formar a coleção de isolados de *D. tritici-repentis* e *D. siccans* utilizados nos ensaios de sensibilidade.

2.2 Postulados de Koch

2.2.1 Isolamento monospórico

Os isolados monospóricos de *D. tritici-repentis* utilizados nos ensaios foram obtidos a partir de folhas com sintomas da doença, coletadas em lavoura, das cultivares de trigo COODETEC 104 (Pitangueiras/PR), BRS Guamirim (Coxilha/RS), Horizonte (Júlio de Castilhos/RS), Quartzo (Ventania/PR) e Onix (Santo Augusto/RS).

Após a esporulação do fungo, adicionou-se em cada placa de Petri água destilada e esterilizada com a finalidade de obter-se uma

suspensão de conídios. Em seguida, com auxílio de um pincel de pelo de camelo número 20, foi realizada a remoção dos propágulos. Dessa suspensão foram pipetados 300 µL para placas de Petri contendo o meio ágar-água (FERNANDEZ, 1993). As placas foram incubadas a 22 °C com fotoperíodo de 12 horas, durante seis horas. Com o auxílio de microscópio óptico e espátula pequenas porções de ágar-água contendo um único conídio germinado foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e, após o crescimento das colônias, transferiu-se o fungo para tubos e preservados na micoteca.

Para a obtenção da coleção de isolados de *D. siccans* não foi possível a realização do isolamento monospórico devido à limitação encontrada na obtenção de esporos do fungo. A coleção de isolados foi obtida por isolamento a partir de folhas com lesões das cultivares de trigo Fundacep 52 (Vacaria/RS), Fundacep 30 (Lagoa Vermelha/RS), Raízes (Panambi/RS), Safira (Coxilha/RS) e Vaqueano (Passo Fundo/RS).

2.2.2 Multiplicação do inóculo

Para a multiplicação do inóculo de *D. tritici-repentis*, primeiramente, discos de micélio com 5 mm de diâmetro de colônias com sete dias de crescimento, foram transferidas para placas de Petri contendo meio V8 e incubados em câmara incubadora tipo BOD (Marca Marconi) a 24±1°C por cinco dias, em escuro. Após este período, as colônias do fungo foram submetidas à raspagem do micélio com o auxílio da base de um tubo de ensaio, na presença de água. O excesso de água foi removido e as placas foram novamente

incubadas sob luz contínua por 24h a $24\pm 1^\circ\text{C}$, seguidos de 24h a $15\pm 1^\circ\text{C}$, na ausência de luz.

Para a multiplicação do inóculo de *D. siccans*, foram transferidos porções da colônia do fungo, para placas de Petri contendo meio de cultura BDA pré-fabricado (200 g de batata, 15 g de sacarose e 12 g de ágar) preparado segundo Fernandez (1993). Essas placas permaneceram em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 12 horas durante sete dias.

2.2.3 Inoculação em plantas

Plantas de trigo do cultivar Mirante foram cultivadas em câmara de crescimento vegetal, em vasos plásticos utilizando como substrato solo peneirado. A inoculação foi realizada no momento em que as plantas atingiram o estágio de três-quatro folhas (20 dias). Suspensões de esporos de *D. tritici-repentis* e, de micélio de *D. siccans* foram preparadas pela dificuldade de esporulação do fungo em meio de cultura. A concentração utilizada foi de 8.000 conídios/mL.

A inoculação foi realizada através de atomização da suspensão do inóculo + 1 gota/L de água de espalhante Tween 20 (polioxietilenoorbitano) nas folhas de trigo. Para o tratamento controle, a atomização foi apenas de água mais o espalhante adesivo. A unidade experimental foi representada por um vaso com cinco plantas e com quatro repetições. Após a inoculação, as plantas permaneceram cobertas com um saco plástico por 24 horas para

mantê-las com molhamento suficiente para favorecer a infecção. As plantas foram mantidas a temperatura de 22 °C e fotoperíodo de 12 horas.

2.2.4 Avaliação

Após duas semanas, foi realizada a avaliação do número de lesões/folha e a mensuração das lesões, com auxílio de um paquímetro digital. Das manchas foliares, 25 discos de 0,9 cm de diâmetro foram reisolados e dispostos em gerbox contendo espuma de nylon e duas folhas sobrepostas de papel filtro, umedecidos com água destilada e esterilizada e mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25°C ± 2 e fotoperíodo de 12 horas. Após oito dias foi realizada a avaliação.

2.2.5 Mensuração de conídios

Para os estudos de morfologia dos conídios de *D. tritici-repentis* foram preparadas placas de Petri com meio de cultura V8 e submetidas à esporulação, conforme metodologia descrita no item 2.2.2, sendo mensurados 200 conídios/isolado. Para *D. siccans* a mensuração não foi realizada pela limitação encontrada na obtenção de esporos. Foram mensurados o comprimento, largura e número de pseudoseptos dos conídios (aumento de 30x), em microscópio ótico com ocular com graduação micrométrica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação dos agentes causais

Associados ao material sintomático de folhas de trigo, foram identificados quatro patógenos agentes causais de manchas foliares: *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*, *D. siccans* e *Stagonospora nodorum*.

Analisando as amostras referentes ao ano de 2008 (Tabela 1), *B. sorokiniana* apresentou incidência de 0 a 30 % (média de 5,94 %), *D. tritici-repentis* de 0 a 72 % (média de 18,00 %) e *D. siccans* de 0 a 75 % (média de 36,00 %). Entre as amostras analisadas no ano de 2009 (Tabela 2) verificou-se a presença de *B. sorokiniana* em incidência de 0 a 100 % (média de 15,05 %), *D. tritici-repentis* em incidência de 12 a 100 % (média de 66,13 %), e *D. siccans* de 0 a 24 % (média de 3,11 %). No ano 2010, verificou-se incidência de *B. sorokiniana* oscilando entre 0 a 21 % (média de 2,19 %), *D. tritici-repentis* entre 0 a 100 % (média de 86,44 %), *D. siccans* entre 0 a 16 % (média de 2,14 %) (Tabela 3). A avaliação referente às amostras do ano 2011, apresentou incidência de *B. sorokiniana* de 0 a 35 % (média de 7,53 %), de 0 a 96 % (média de 66,35 %) para *D. tritici-repentis*, de 0 a 20 % (média de 3,12 %) para *D. siccans* e de 0 a 100 % (média de 6,24 %) para *S. nodorum* (Tabela 4).

Verificou-se na safra 2008, frequência de *B. sorokiniana* de 56,25 %, *D. tritici-repentis* de 62,50 % e *D. siccans* de 87,50 % (Tabela 1), na região de VCU I. Considerando a safra de 2009, a frequência de *B. sorokiniana* foi de 69,73 %, *D. tritici-repentis* de

100,00 % e *D. siccans* de 32,89 % (Tabela 2), na região de VCU I, II e III. Na safra 2010 a frequência de *B. sorokiniana* foi de 30,55 %, *D. tritici-repentis* de 100,00 % e *D. siccans* de 33,34 % (Tabela 3), na região de VCU I, II e III e frequência de 55,88 % de *B. sorokiniana*, 100,00 % de *D. tritici-repentis*, 38,23 % de *D. siccans* e *S. nodorum* de 8,82 %, respectivamente, na safra 2011(Tabela 4) na região de VCU I, II, III e IV.

Observou-se a ocorrência dos fungos *B. sorokiniana* e *D. tritici-repentis* nas regiões de VCU I, considerada fria/úmida/alta, região de VCU II sendo moderadamente quente/úmida/baixa, região de VCU III, considerada quente/moderadamente seca/baixa do estado e região de VCU IV sendo quente/seca - Cerrado. *D. siccans* foi detectado nas regiões VCU I e II, não sendo encontrado na região VCU III e IV, sendo o mesmo observado para *S. nodorum*.

Tabela 1. Incidência^x de fungos associados a manchas foliares em cultivares de trigo na região VCU I, safra 2008

| Cultivar | Local | Região (VCU)* | <i>Bipolaris sorokiniana</i> | <i>Drechslera tritici-repentis</i> | <i>D. siccans</i> |
|----------------------|-----------------------------|---------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Pampeano | Coxilha | I | 0 | 0 | 75 |
| Fund.30 ^y | L. Vermelha ^y | I | 0 | 0 | 30 |
| Quartzo | M. Castelhana ^y | I | 0 | 0 | 52 |
| Quartzo | Coxilha | I | 0 | 48 | 4 |
| Abalone | Vacaria | I | 0 | 4 | 24 |
| Supera | L. Vermelha | I | 4 | 0 | 50 |
| Raízes | L. Vermelha | I | 0 | 0 | 50 |
| Louro | L. Vermelha | I | 12 | 4 | 60 |
| Abalone | Passo Fundo | I | 8 | 65 | 16 |
| Marfim | Vacaria | I | 8 | 0 | 72 |
| Supera | Vacaria | I | 0 | 4 | 60 |
| Guamirim | L. Vermelha | I | 16 | 4 | 75 |
| Safira | P. das Missões ^y | I | 4 | 12 | 0 |
| Guabijú | L. Vermelha | I | 10 | 25 | 4 |
| Fund.52 ^y | Coxilha | I | 30 | 50 | 4 |
| Safira | Passo Fundo | I | 3 | 72 | 0 |
| Média | | | 5,94 | 18,00 | 36,00 |
| Frequência | | | 56,25 | 62,50 | 87,50 |

^y Fundacep 52, Fundacep 30, Lagoa Vermelha, Mato Castelhana, Palmeira das Missões.

^xIncidência (%) determinada em discos de 6mm de diâmetro recortados de manchas foliares e incubados 25 por amostra. *Valor de Cultivo e Uso.

Tabela 2. Incidência^x de fungos associados a manchas foliares em cultivares de trigo na região VCU I, II, III, na safra 2009

| Cultivar | Local | Região (VCU)* | <i>Bipolaris sorokiniana</i> | <i>Drechslera tritici-repentis</i> | <i>D. siccans</i> |
|-------------|-----------------------|---------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Safira | Coxilha | I | 12 | 72 | 24 |
| Ônix | Coxilha | I | 32 | 40 | 8 |
| Abalone | Coxilha | I | 20 | 52 | 12 |
| Fundacep 52 | Espumoso | I | 0 | 67 | 0 |
| Safira | Coxilha | I | 4 | 44 | 8 |
| Mirante | Coxilha | I | 8 | 40 | 4 |
| Marfim | Coxilha | I | 12 | 40 | 4 |
| BRS 296 | Carazinho | I | 12 | 75 | 0 |
| Quartzo | Coxilha | I | 20 | 12 | 0 |
| Quartzo | Carazinho | I | 12 | 81 | 0 |
| Ônix | Ciríaco | I | 20 | 86 | 12 |
| Valente | Coxilha | I | 0 | 32 | 0 |
| Guamirim | Carazinho | I | 12 | 24 | 0 |
| Nova Era | Ibiraíaras | I | 4 | 80 | 16 |
| Marfim | Carazinho | I | 16 | 60 | 12 |
| Quartzo | Chapada | I | 40 | 52 | 4 |
| Abalone | Chapada | I | 20 | 100 | 0 |
| Pampeano | Coxilha | I | 16 | 38 | 16 |
| Marfim | Chapada | I | 16 | 96 | 4 |
| Campeiro | Chapada | I | 12 | 94 | 8 |
| Quartzo | Carazinho | I | 20 | 20 | 12 |
| Raízes | Carazinho | I | 4 | 24 | 0 |
| Mirante | Chapada | I | 24 | 96 | 0 |
| Campeiro | Ciríaco | I | 0 | 12 | 0 |
| Quartzo | Ciríaco | I | 60 | 24 | 12 |
| Mirante | Ciríaco | I | 92 | 28 | 0 |
| Safira | Ciríaco | I | 8 | 32 | 12 |
| Abalone | P. Fundo ^y | I | 4 | 84 | 4 |
| Ônix | Ciríaco | I | 24 | 44 | 12 |
| Guamirim | Tucunduva | II | 4 | 92 | 0 |
| Raízes | Tucunduva | II | 100 | 20 | 0 |
| Fundacep 52 | Tucunduva | II | 76 | 96 | 4 |
| Mirante | Tucunduva | II | 8 | 96 | 0 |
| Quartzo | Tucunduva | II | 8 | 85 | 0 |
| Safira | S. Rosa ^y | II | 0 | 100 | 0 |
| BRS 296 | C. Novo ^y | II | 95 | 40 | 0 |
| Cristalino | Tucunduva | II | 4 | 100 | 0 |
| Guamirim | C. Novo | II | 14 | 96 | 8 |
| BRS 208 | C. Novo | II | 4 | 92 | 8 |
| Safira | C. Novo | II | 0 | 100 | 0 |
| Horizonte | Tucunduva | II | 46 | 100 | 0 |
| CD 117 | C. Novo | II | 16 | 76 | 4 |

Cont. Tabela 2

| | | | | | |
|-------------|-----------|-----|-------|--------|-------|
| CD 114 | C.Novo | II | 12 | 100 | 12 |
| Cristalino | C.Novo | II | 12 | 80 | 0 |
| Raízes | Ijuí | II | 8 | 96 | 4 |
| Horizonte | C. Novo | II | 4 | 100 | 8 |
| Raízes | C. Novo | II | 8 | 96 | 0 |
| Quartzo | Ijuí | II | 4 | 100 | 0 |
| Marfim | Ijuí | II | 0 | 100 | 0 |
| 7051 | Faxinal | II | 0 | 100 | 0 |
| Asteca | Faxinal | II | 0 | 72 | 0 |
| 6022 | Faxinal | II | 8 | 68 | 0 |
| CD 104 | Faxinal | II | 12 | 52 | 0 |
| Bio 06007 | Faxinal | II | 0 | 68 | 0 |
| BRS 208 | Faxinal | II | 8 | 52 | 0 |
| BRS 220 | Faxinal | II | 28 | 40 | 0 |
| Valente | Faxinal | II | 4 | 52 | 0 |
| 6027 | Faxinal | II | 0 | 76 | 0 |
| 7218 | Faxinal | II | 0 | 80 | 0 |
| 6016 | Faxinal | II | 4 | 84 | 0 |
| 7052 | Faxinal | II | 0 | 80 | 0 |
| 6011 | Faxinal | II | 0 | 80 | 0 |
| 6004 | Faxinal | II | 0 | 85 | 0 |
| 6014 | Faxinal | II | 0 | 80 | 0 |
| Quartzo | Faxinal | II | 0 | 89 | 0 |
| Mirante | Faxinal | II | 0 | 100 | 0 |
| Mirante | Ventania | II | 0 | 12 | 0 |
| Ônix | Ventania | II | 0 | 60 | 0 |
| Asteca | Cambé | III | 0 | 48 | 0 |
| Mirante | Cambé | III | 0 | 56 | 0 |
| IPR 136 | Cambé | III | 4 | 48 | 0 |
| Supera | Cambé | III | 0 | 16 | 0 |
| Valente | Cambé | III | 0 | 24 | 0 |
| Quartzo | Cambé | III | 4 | 36 | 0 |
| BRS Tangará | Apucarana | III | 54 | 68 | 0 |
| CD 116 | Apucarana | III | 61 | 86 | 0 |
| Média | | | 15,05 | 66,13 | 3,11 |
| Frequência | | | 69,73 | 100,00 | 32,89 |

^yCampo Novo, Passo Fundo, Santa Rosa ^xIncidência (%) determinada em discos de 6mm de diâmetro recortados de manchas foliares e incubados 25 por amostra.

*Valor de Cultivo e Uso.

Tabela 3. Incidência^x de fungos associados a manchas foliares em cultivares de trigo na região VCU I, II, III, na safra 2010

| Cultivar | Local | Região (VCU)* | <i>Bipolaris sorokiniana</i> | <i>Drechslera tritici-repentis</i> | <i>D. siccans</i> |
|-------------|---------------------------|---------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Horizonte | J.Castilhos | I | 0 | 96 | 12 |
| Safira | Passo Fundo | I | 0 | 93 | 3 |
| Safira | Coxilha | I | 0 | 100 | 4 |
| Safira | Vacaria | I | 0 | 100 | 4 |
| Mirante | Vacaria | I | 0 | 74 | 0 |
| Fundacep 52 | Vacaria | I | 0 | 92 | 4 |
| Pioneiro | Passo Fundo | I | 18 | 75 | 4 |
| Guamirim | J. Castilhos ^y | I | 4 | 42 | 16 |
| Mirante | Passo Fundo | I | 0 | 93 | 0 |
| BRS 220 | C. Mourão ^y | II | 0 | 88 | 0 |
| Quartzo | C. Mourão | II | 4 | 96 | 0 |
| Vaqueano | S. Augusto ^y | II | 0 | 94 | 5 |
| Itaipú | S. Augusto | II | 0 | 86 | 0 |
| Alcover | S. Augusto | II | 0 | 84 | 0 |
| Raízes | Panambi | II | 21 | 67 | 12 |
| Ivaí | S. Augusto | II | 0 | 85 | 0 |
| Abalone | S. Augusto | II | 0 | 85 | 7 |
| Abalone | Ventania | II | 0 | 64 | 3 |
| Quartzo | Ventania | II | 0 | 79 | 0 |
| Mirante | Ventania | II | 4 | 83 | 0 |
| Mirante | S. Augusto | II | 0 | 83 | 0 |
| Ônix | S. Augusto | II | 0 | 92 | 0 |
| Safira | Entre Ijuís | II | 4 | 83 | 3 |
| Quartzo | Faxinal | II | 0 | 40 | 0 |
| Safira | Piratuba | II | 4 | 100 | 0 |
| Valente | Pitangueiras | III | 4 | 100 | 0 |
| Taurum | Pitangueiras | III | 8 | 100 | 0 |
| CD 104 | Pitangueiras | III | 4 | 100 | 0 |
| Bio 007051 | Pitangueiras | III | 4 | 100 | 0 |
| Abalone | Pitangueiras | III | 0 | 86 | 0 |
| Ivaí | Pitangueiras | III | 0 | 85 | 0 |
| Itaupú | Pitangueiras | III | 0 | 79 | 0 |
| Mirante | Pitangueiras | III | 0 | 92 | 0 |
| BRS Tangará | Pitangueiras | III | 0 | 100 | 0 |
| BRS Pardela | Pitangueiras | III | 0 | 100 | 0 |
| BRS 208 | Pitangueiras | III | 0 | 96 | 0 |
| Média | | | 2,19 | 86,44 | 2,14 |
| Frequência | | | 30,55 | 100,00 | 33,34 |

^yCampo Mourão, Júlio de Castilhos, Santo Augusto ^xIncidência (%) determinada em discos de 6mm de diâmetro recortados de manchas foliares e incubados 25 por amostra. *Valor de Cultivo e Uso.

Tabela 4. Incidência^x de fungos associados a manchas foliares em cultivares de trigo na região VCU I, II, III, na safra 2011

| Cultivar | Local | Região VCU)* | <i>B.sorokiniana</i> | <i>D.tritici-repentis</i> | <i>D.siccans</i> | <i>S.nodorum</i> |
|------------------------|---------------------------|--------------|----------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| Mirante | M.Castelhana ^y | I | 0 | 88 | 0 | 12 |
| Safira | Erebango | I | 0 | 89 | 3 | 0 |
| Marfim | Passo Fundo | I | 26 | 65 | 0 | 0 |
| Mirante | Passo Fundo | I | 9 | 82 | 3 | 0 |
| Safira | M.Castelhana | I | 0 | 94 | 0 | 0 |
| Marfim | P. Missões ^y | I | 0 | 90 | 0 | 0 |
| BRS 220 | P. Grossa ^y | I | 24 | 44 | 12 | 0 |
| CD 116 | Castro | I | 20 | 36 | 3 | 0 |
| Mirante | P. Grossa | I | 16 | 44 | 16 | 0 |
| CD 114 | Cascavel | II | 0 | 0 | 0 | 100 |
| CD 117 | Cascavel | II | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Marfim | Entre Ijuís | II | 4 | 80 | 16 | 0 |
| Campeiro | Entre Ijuís | II | 4 | 68 | 16 | 0 |
| Quartzo | Entre Ijuís | II | 14 | 85 | 4 | 0 |
| Mirante | Entre Ijuís | II | 10 | 80 | 0 | 0 |
| Horizonte | Santa Rosa | II | 0 | 74 | 3 | 0 |
| Safira | Santa Rosa | II | 0 | 96 | 0 | 0 |
| Mirante | Santa Rosa | II | 0 | 63 | 0 | 0 |
| Quartzo | Ventania | II | 0 | 74 | 0 | 0 |
| Horizonte | Santo Augusto | II | 0 | 72 | 0 | 0 |
| Mirante | Santo Augusto | II | 6 | 93 | 3 | 0 |
| Itaipu | Santo Augusto | II | 0 | 75 | 3 | 0 |
| Quartzo | Santo Augusto | II | 0 | 71 | 0 | 0 |
| Guamirim | Santo Augusto | II | 12 | 80 | 4 | 0 |
| Pioneiro | Santo Augusto | II | 20 | 64 | 0 | 0 |
| BRS Tang. ^y | Tibagi | II | 8 | 40 | 0 | 0 |
| CD 116 | Tibagi | II | 12 | 32 | 0 | 0 |
| BRS 220 | Tibagi | II | 35 | 30 | 20 | 0 |
| BRS Tang. | Itapeva | II | 4 | 61 | 0 | 0 |
| Pardela | Arapongas | III | 4 | 92 | 0 | 0 |
| CD 116 | Arapongas | III | 0 | 90 | 0 | 0 |
| ONIX | Indianópolis | III | 0 | 72 | 0 | 0 |
| BRS 264 | Indianópolis | III | 16 | 68 | 0 | 0 |
| BRS 254 | Indianópolis | III | 12 | 64 | 0 | 0 |
| Média | | | 7,53 | 66,35 | 3,12 | 6,24 |
| Frequência | | | 55,88 | 100,00 | 38,23 | 8,82 |

^yBRS Tangará, Mato Castelhana, Palmeira das Missões, Ponta Grossa. ^xIncidência (%) determinada em discos de 6mm de diâmetro recortados de manchas foliares e incubados 25 por amostra. *Valor de Cultivo e Uso.

Nas amostras referentes ao ano de 2008 os patógenos *B. sorokiniana*, *D. tritici-repentis* e *D. siccans* foram detectados. O fungo *D. siccans* foi constatado pela primeira vez em amostras foliares de trigo, constituindo assim, o primeiro relato desta espécie no Brasil. As amostras do ano de 2008 apresentaram incidência e frequência superiores de *D. siccans* a *D. tritici-repentis* e *B. sorokiniana* (Tabela 1).

Stolte (2009), em trabalho visando determinar a etiologia de manchas foliares também relata que em avaliação de amostras correspondentes ao ano de 2005 detectou a presença de uma outra espécie de *Drechslera*, provavelmente *D. siccans* que, pela dificuldade de produção de conídios em meio artificial, não foi mensurada, mas visualmente apresentava tamanho de conídios menores do que os de *D. tritici-repentis*. A incidência variou de 2 a 20%.

Amostras correspondentes a safra agrícola 2009 apresentaram incidência e frequência superiores de *D. tritici-repentis* a *B. sorokiniana* e *D. siccans* (Tabela 2).

Na análise das amostras da safra 2010, o fungo *D. tritici-repentis* também apresentou maior frequência e incidência nas amostras avaliadas e apenas os gêneros *Drechslera* e *Bipolaris* foram encontrados (Tabela 3), conduzindo a suspeita de que poderia existir resistência do fungo *D. tritici-repentis*, aos fungicidas empregados nas lavouras de trigo, face a dificuldade de controle da mancha-amarela nas últimas safras em diversas regiões do Brasil.

Dados referentes à safra 2011, mostram a ocorrência dos

fungos *D. tritici-repentis*, *B. sorokiniana*, *D. siccans* e *S. nodorum*, sendo que a ocorrência de *S. nodorum* foi registrada somente nesta safra, não se observando nas demais em estudo. O fungo *D. tritici-repentis* predominou nas amostras avaliadas, com frequência de 100 % (Tabela 4).

Nota-se que, em nenhuma das amostras analisadas envolvendo estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Santa Catarina, o fungo *S. tritici*, foi encontrado. Conforme Reunião (2011), as principais manchas foliares do trigo, na região sul do Brasil, são a mancha-amarela da folha, causada por *Drechslera* spp., a mancha marrom causada por *B. sorokiniana* e a septoriose causada por *S. nodorum*, os resultados encontrados no presente estudo confirmam os agentes causais.

Danelli et al. (2011), em estudos de etiologia e intensidade de manchas foliares em cultivares de trigo em três locais do Rio Grande do Sul, Brasil relata que os principais fungos causadores de manchas foliares em Passo Fundo, Santo Augusto e Vacaria foram *B. sorokiniana* (0,67%), *D. siccans* (18,0%), *D. tritici-repentis* (43,0%) e *S. nodorum* (51,0%), registrando a presença de *D. siccans* e o ressurgimento de *S. nodorum*, que conforme os resultados obtidos no trabalho, foi detectado somente na safra 2011.

O trabalho conduzido por Soares & Castro (2003), indicou que tanto as cultivares como as linhagens mostraram-se mais suscetíveis às manchas foliares do que ao oídio e à ferrugem da folha, em avaliação de cultivares do Ensaio Estadual e linhagens do Ensaio Regional de trigo no Rio Grande do Sul, safra de 2002. Prestes et al.

(2002), em estudos sobre a incidência de manchas foliares em trigo, descreve que dentre os fungos associados as manchas foliares observaram a predominância na seguinte ordem, *S. nodorum*, *D. tritici-repentis* e *B. sorokiniana*.

3.2 Postulados de Koch

As plantas testemunhas pulverizadas com água + espalhante Tween 20 não apresentaram sintomas. Após o período de incubação (15 dias), foram observados sintomas de mancha-amarela. Os sintomas observados foram semelhantes aos descritos na literatura, iniciaram por pequenas manchas cloróticas, com o passar do tempo a área de tecido amarelecido aumentou em diâmetro surgindo uma região necrosada, de cor parda. Tanto a borda de tecido amarelecido como o centro morto, aumentaram em área, em função do tempo.

O nome comum da doença, mancha amarela, deve-se a presença da borda ou halo de tecido amarelecido, pronunciado, que circunda as lesões. A borda ou halo amarelo é atribuído a produção de toxina pelo agente causal (LAMARI & BERNIER, 1989).

O número de lesões/folha em trigo, inoculada com *D. tritici-repentis*, variou de 11 a 52 lesões (Tabela 5). Para *D. siccans* o número de lesões/folha variou de 2 a 10 lesões (Tabela 6).

O tamanho de lesões de *D. tritici-repentis* encontrado oscilou de 1,09 a 12,84 mm (Tabela 5). Este valor está de acordo com o descrito por Reis & Casa (1996), os quais relatam que o diâmetro das lesões pode atingir 12 mm de comprimento.

Tabela 5. Número de lesões/folha, tamanho de lesões e severidade foliar de isolados de *Drechslera tritici-repentis* em trigo

| Isolado | Lesões folha (n°) | Tamanho de lesões (mm) | Severidade estimada (%) |
|----------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 01/QTZ | 14-45 (28,75)* | 1,09**-12,17*** | 80 |
| 02/ONX | 14-36 (26,85) | 2,06-7,64 | 48 |
| 03/HTZ | 12-42 (22,6) | 2,30- 8,20 | 62 |
| 04/GUA | 16-52 (30,85) | 1,43-12,84 | 70 |
| 05/CD | 11-39 (24,32) | 2,12-9,46 | 60 |

*valores entre parênteses representam as médias **mínima ***máxima (mm)

Quanto à severidade da doença, o isolado 01/QTZ apresentou maiores valores (80%) e o isolado 02/ONX, foi atribuído o menor valor. Conforme menciona Luo & Zeng (1995), o caráter expansão de lesão também pode ser usado para avaliar a agressividade de estirpes ou raças de bactérias e de fungos patogênicos.

Para o fungo *D. siccans* o tamanho de lesões variou de 1,02 a 4,46 mm (Tabela 6). Os resultados das inoculações confirmam a patogenicidade de *D. tritici-repentis* e *D. siccans* em trigo. Os baixos valores de lesões/folha de *D. siccans* podem ser devidos ao predomínio de micélio na suspensão inoculada e não de conídios.

Tabela 6. Número de lesões/folha e tamanho de lesões de isolados de *Drechslera siccans* em trigo

| Isolado | Lesões folha (n^o) | Tamanho de lesões (mm) |
|----------------|---|-----------------------------------|
| 01/F30 | 2 - 8 (4)* | 1,02** - 3,75*** |
| 02/RZ | 2 - 5 (3) | 2,08 - 3,22 |
| 03/SF | 3 - 6 (3,8) | 2,30 - 4,29 |
| 04/F52 | 5 - 10 (6,2) | 1,43 - 2,12 |
| 05/VQ | 3 - 8 (5,6) | 2,14 - 4,46 |

* valores entre parênteses representam as médias ** mínima *** máxima (mm)

Os valores mínimos, máximos e médias das características conidiais estudadas, comprimento, largura e número de pseudoseptos constam na Tabela 7. Dentro do grupo dos fungos dematiáceos Hyphomicetes como dos gêneros *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum*, o tamanho dos conídios e o número de septos por conídios constituem-se num critério importante para a separação de espécies (HARDING, 1975a).

Na mensuração de conídios, obteve-se valores mínimos e máximos entre 50-340 (média 176) μm de comprimento, 10-15 (média 10,38) μm de largura e 1 -11 (média 6) pseudoseptos, que comparada com a descrição do fungo por Wiese (1987) 45-200 μm x 12-21, 4 a 7 pseudoseptos ou 80-250 (117) x 14-20 (17,7) μm e 1-9 pseudoseptos segundo Ellis (1971), assemelha-se a *D. tritici-repentis*. O valor máximo do comprimento de conídios apresentou limite superior maior que o descrito por Ellis (1971) e Wiese (1987), mas dentro da média citada pelos autores. Valores mínimos de largura dos conídios se assemelham aos citados por Stolte (2009). O número de pseudoseptos encontrados (1 a 11) apresentou um limite superior

maior que o descrito por Ellis (1971) (1 a 9) e por Wiese (1987) (4 a 7), mas também dentro da média citada pelos autores. As dimensões dos conídios variam entre os isolados e com as condições que são produzidos (OU, 1972).

De acordo com Lutrell (1955), a ocorrência de temperaturas altas (28°C) induzem a formação de conídios curtos, enquanto que temperaturas baixas (14°C) favorecem a produção de conídios mais longos. Na metodologia utilizada para a obtenção de esporos do fungo, em estudo, a colônia permaneceu 24h no escuro, a 15°C, o que pode ser explicado pelas diferenças encontradas. O comprimento, largura e septos podem variar com a concentração de glicose adicionada ao meio de cultura, exercendo um marcado efeito sobre essas características (ELLIOTT, 1949). Outros fatores, como o pH inicial do meio, fontes de nitrogênio e a idade do meio de cultura, podem também afetar tais características (TARR & KAFI, 1968; HARDING, 1975b; RUPPEL, 1974).

Moschen (2008), na mensuração de conídios em meio V8-água, encontrou valores mínimos e máximos de 140-250 µm de comprimento, 15-25 µm de largura e média de 4 pseudoseptos. Valores encontrados no presente trabalho, utilizando o mesmo substrato, na média apresentaram valores mínimos e máximos oscilando entre 50 -340 µm de comprimento, 10-15 µm de largura e média de 6 pseudoseptos. Stolte (2009), na mensuração de conídios obtidos em meio V8, encontrou valores de comprimento e largura 70-270 x 10-25 µm e média de 7 pseudoseptos.

Os conídios observados, ao microscópio óptico apresentaram morfologia idêntica a do fungo *D. tritici-repentis*, isto é,

conídios solitários, cilíndricos, retos ou ligeiramente curvados, arredondados no ápice e a base caracteriza-se por possuir forma cônica, conhecida como cabeça de cobra, subhialinos a ligeira coloração palha (ELLIS,1971).

Tabela 7. Valores mínimos, máximos e média do comprimento, largura e número de pseudoseptos de esporos de cinco isolados de *Drechslera tritici-repentis*

| Isolado | Comprimento μm | Largura | Pseudoseptos (n°) |
|--------------|-------------------|-----------------|----------------------|
| 01/QTZ | 50 - 340 (180)* | 10 - 15 (10,7)* | 1 - 11 (5,6)* |
| 02/ONX | 60 - 250 (176) | 10 - 10 (10) | 2 - 11 (7,2) |
| 03/HTZ | 60 - 260 (180) | 10 - 10 (10) | 2 - 11 (7,4) |
| 04/GUA | 60 - 230 (169) | 10 - 15 (11,2) | 2 - 8 (5,7) |
| 05/CD | 70 - 250 (177) | 10 - 10 (10) | 2 - 10 (6,6) |
| Média | 60 - 266 (176) | 10 - 12 (10,38) | 1,8 - 10,2(6,5) |

* valores entre parênteses representam as médias

4 CONCLUSÕES

O fungo *Drechslera siccans* foi constatado pela primeira vez em amostras foliares de trigo na safra 2008, constituindo assim, o primeiro relato desta espécie no Brasil.

Os fungos *D. tritici-repentis*, *D. siccans*, *B. sorokiniana* e *S. nodorum*, são os principais agentes causais de manchas foliares em trigo na região Sul do Brasil.

A ocorrência dos fungos, agentes causais de manchas foliares em trigo, não é constante ao longo das safras.

O fungo *Drechslera tritici-repentis* predomina em manchas foliares de trigo.

Não houve a presença em nenhuma das amostras analisadas nos anos de 2008 a 2010, dos fungos *S.nodorum* e/ou *S. tritici*, também causadores de manchas foliares em trigo.

Os isolados de *Drechslera tritici-repentis* e *D. siccans* foram patogênicos em trigo.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E CRESCIMENTO MICELIANO *IN VITRO* DE *Drechslera tritici-repentis* EM DIFERENTES SUBSTRATOS SÓLIDOS

ROSANE BALDIGA TONIN¹ & ERLEI MELO REIS²

RESUMO - O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo/UPF, com o objetivo de avaliar a esporulação e o crescimento miceliano de *Drechslera tritici-repentis* em diferentes substratos. A esporulação foi avaliada em sete meios de cultura agarizados: alimento infantil, BDA, extrato de folha de trigo, farinha integral de trigo, farinha integral de centeio, suco de tomate e suco V8-ágar. Para a indução de esporulação, foram avaliadas concomitantemente duas técnicas. Os dados foram expressos em número de esporos/cm² do substrato. Para a avaliação do crescimento miceliano, foram estudados oito meios de cultura compostos de alimento infantil; BDA; BDA pré-fabricado; extrato de malte, extrato de folha de trigo, farinha de trigo; suco de tomate e suco V8-ágar e, submetidos a dois regimes de luz: escuro e fotoperíodo de 12h. O

¹Eng. Agr., M. Sc., doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. rosanetonin@yahoo.com.br

²Orientador, Eng. Agr., Ph.D., professor da FAMV/PPGAgro/UPF - erleireis@tpo.com.br

delineamento dos ensaios foi de tratamentos inteiramente casualizados, com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No meio de cultura suco V8-Ágar, associado à técnica do estresse do micélio, na presença de água, obteve-se maior esporulação de *D. tritici-repentis*. Para crescimento miceliano o meio extrato de folha de trigo e BDA pré-fabricado mostraram-se promissores para condução de testes de fungitoxicidade pelo seu baixo custo, características de colônia e praticidade.

Palavras-chave: *Pyrenophora tritici-repentis*, meio de cultura, mancha-amarela, trigo.

**IN VITRO CONIDIA PRODUCTION AND MYCELIAL
GROWTH OF *Drechslera tritici-repentis* ON
DIFFERENT SOLID SUBSTRATES**

ABSTRACT - The study was conducted at the Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo/UPF, to evaluate the mycelial growth and the sporulation of *D. tritici-repentis* on different substrates. The pathogen sporulation was evaluated on seven agar media: V8 juice-agar, baby food, wheat leaf extract, PDA (Potato- Dextrose- Agar), tomato juice, wheat flour and rye flour. For sporulation induction in the culture media two techniques were compared. The data were transformed into spore/cm² number. Eight culture media for mycelium growth were studied: malt extract, wheat leaf extract, tomato juice, V8-agar, PDA,

wheat flour, dehydrated PDA, submitted to different light regimes: dark and 12h photoperiod. The experimental design was a complete randomized with five replications. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 0.005. The highest spore production was obtained in V8 juice-agar associated to the mycelium stress in the presence of water. For mycelial growth the best substrates were wheat leaf extract, dehydrated BDA which can be used to perform fungitoxicity tests due to its low cost, and convenient colony features.

Keywords: *Pyrenophora tritici-repentis*, culture medium, wheat, yellow spot.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma das principais culturas agrícolas do Sul do Brasil, sendo um cereal adaptado a diferentes regiões e cultivado em todos os continentes do mundo (LANZARINI, 2006).

A mancha-amarela do trigo, cujo agente causal é o fungo *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker, é de ocorrência mundial, sendo a mancha foliar mais freqüente e mais intensa nas lavouras em que o trigo é cultivado em monocultura e em sistema plantio direto (REES & PLATZ, 1980; REIS et al., 2011).

A mancha-amarela foi relatada como doença importante na Austrália (REES & PLATZ, 1979), no Canadá (WRIGHT & SUTTON, 1990) e nos Estados Unidos (HOSFORD, 1982). No Brasil, a primeira referência sobre o agente causal foi feita por Costa Neto (1967), relatando a ocorrência no Rio Grande do Sul, em 1959. Mehta (1993), relatou ocorrência de epidemia da doença, no estado do Paraná em 1973. O fungo foi detectado em sementes de trigo, no Brasil, em 1976 (LUZ & LUZZARDI, 1976).

Mesmo sendo um microorganismo amplamente estudado, o fungo *D. tritici-repentis* apresenta uma série de limitações de esporulação e crescimento em condições controladas.

A qualidade e intensidade da luz são fatores que podem influenciar o crescimento vegetativo, induzir a formação de estruturas reprodutivas, forma e tamanho dos esporos de muitas espécies fúngicas. A ausência de luz também podem induzir ou inibir o crescimento e a esporulação de alguns fungos (MATHUR &

NEERGAARD, 1973; MINUSSI et al., 1977; TEIXEIRA et al., 2001).

O cultivo *in vitro* deste fungo é de grande importância para condução de trabalhos de pesquisa que exijam produção de inóculo em larga escala. Para isso, é necessário estabelecer condições ideais para a produção de esporos e crescimento miceliano deste fitopatógeno.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo testar substratos e técnicas para a produção de esporos e, selecionar o melhor meio de cultura para o crescimento miceliano para condução de estudos envolvendo testes de fungitoxicidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo/UPF.

2.1 Obtenção do inóculo

A cepa monospórica de *D. tritici-repentis* utilizada nos ensaios foi obtida por isolamento a partir de folhas com sintomas da doença, coletadas em lavoura, da cultivar de trigo BRS Guamirim, procedente de Coxilha/RS.

2.2 Composição dos meios de cultura para produção de esporos

Os substratos utilizados com as respectivas composições foram: 1) alimento infantil - 75g de alimento infantil (contendo água, cenoura, batata, feijão, cebola, chuchu, óleo de milho, polpa de tomate, leite desnatado, soro de leite, óleo de canola, amido, farinha de arroz, beterraba, sal (Produto de Nestlé Brasil Ltda), 14g ágar, 1L água destilada (ALMEIDA, 1976), 2) BDA - 39g de BDA (Marca Merch), 1L água destilada, 3) extrato de folha de trigo - 3g de folha de trigo, 20 g de BDA, 8 g de ágar e 1L de água destilada, 4) Farinha integral de centeio - 50g de farinha de centeio, 14g de ágar e 1L de água destilada, 5) farinha integral de trigo - 50g de farinha de trigo, 14g de ágar e 1L de água destilada, 6) Suco de tomate – 200 mL suco de tomate (Produto da Campbell Soup Co., contendo suco concentrado de tomate, sal e antioxidante ácido ascórbico; 14g ágar, 3g CaCO₃ e 800ml água destilada, 7) Suco V8-ágar - 200 mL suco V8 (Produto da Campbell Soup Co., (contendo mistura de sucos vegetais: cenoura, aipo, beterraba, salsa, alface, agrião e espinafre, sal, antioxidante, ácido ascórbico, acidulante ácido cítrico e aromatizante), 3g CaCO₃, 14g ágar, 800ml água destilada (TUIITE, 1969).

Após o preparo, todos os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem durante 20 minutos a 121°C. Em seguida, foram vertidos em placas de Petri plásticas (tamanho 90 x 15 mm) em câmara de fluxo laminar.

2.2.1 Metodologia para produção de conídios

Primeiramente, discos de micélio de 5 mm de diâmetro, obtidos de colônias puras do fungo, foram transferidos para placas contendo os diferentes meios e incubados em câmara incubadora tipo BOD (Marca Marconi), em escuro contínuo, a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco dias. Após este período, as colônias do fungo foram submetidas a duas técnicas: Técnica 1 - estresse da colônia pela raspagem do micélio com o auxílio da base de um tubo de ensaio, na presença de água; Técnica 2 - estresse da colônia pela raspagem do micélio com auxílio de lâmina microscópica esterilizada, na ausência de água. As placas foram novamente incubadas por 24h a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, com presença de luz contínua e, em seguida mantidas a $15\pm 1^{\circ}\text{C}$, em escuro por mais 24h. O procedimento utilizado foi baseado na metodologia descrita por Lamari & Bernier, (1989), com modificações.

2.2.2 Avaliação *in vitro*

Após um período de sete dias procedeu-se a avaliação. A colônia em esporulação foi avaliada quanto à quantidade de esporos produzidos/cm². Para a quantificação da esporulação adicionou-se cinco mL de água destilada em cada placa, fez-se a raspagem da colônia para a remoção dos esporos com o auxílio de um pincel pelo de camelo número 20, e posterior contagem dos conídios em microscópio. A suspensão de conídios obtida foi transferida para tubos de ensaio. Os tubos foram agitados em agitador tipo vortex e retiradas quatro alíquotas de 10 μL por tubo, depositadas em lâminas

microscópicas e, por varredura, sob microscópio óptico, contados os conídios. Os dados foram expressos em número de conídios/cm² do substrato.

2.2.3 Diâmetro das colônias

A avaliação foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital marca Mitutoyo, medindo-se em dois sentidos perpendiculares o diâmetro das colônias (mm), submetidas às técnicas de estresse pela raspagem do micélio na presença e ausência de água com a parte inferior do tubo de ensaio e lâmina microscópica esterilizada, após um período de sete dias de crescimento.

2.2.4 Delineamento experimental

A unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri. Os experimentos foram realizados duas vezes utilizando-se para a análise estatística a média dos dois ensaios.

O delineamento do ensaio foi de tratamentos inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 2 (meios de cultura x técnicas), com cinco repetições.

Os resultados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT (SILVA & AZEVEDO, 2006).

2.3 Metodologia para crescimento miceliano

Para a avaliação do efeito dos diferentes meios de cultura, no desempenho do crescimento radial das colônias do fungo, foram testados oito meios de cultura agarizados.

Os substratos empregados no estudo foram: 1) alimento infantil, 2) BDA (Marca Merch), 3) BDA pré-fabricado (extrato de 200g de batata, 20g de dextrose e 14 g de ágar), 4) extrato de folha de trigo, 5) extrato de malte (20g extrato malte, 1g peptona, 20g dextrose, 14g ágar, 1L água destilada (TUIITE, 1969), 6) farinha de trigo, 7) suco de tomate, 8) suco V8-Ágar. A composição dos meios seguem a metodologia descrita no item 2.2.

No dia seguinte ao preparo dos meios de cultura, discos de micélio com 5 mm de diâmetro de colônias com sete dias de crescimento, foram transferidos para o centro das placas contendo os meios diferenciados. As colônias foram submetidas a dois regimes de luz: escuro (placas cobertas com papel alumínio) e fotoperíodo de 12h.

As placas dos tratamentos com luz foram distribuídas ao acaso, em câmara de crescimento, com lâmpadas OSRAM Universal, 40 watts, fotoperíodo 12 horas a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. As unidades experimentais do regime escuro foram envolvidas em papel alumínio e distribuídas ao acaso, em local fechado, em câmara de crescimento.

2.3.1 Avaliação

A avaliação foi realizada com um paquímetro digital (marca Mitutoyo), medindo o diâmetro das colônias, em dois sentidos perpendiculares, quando o crescimento do fungo em um dos tratamentos atingiu à borda da placa.

Os experimentos foram repetidos duas vezes, utilizando na análise estatística a média dos dois experimentos.

O delineamento do ensaio foi de tratamentos inteiramente casualizado, em esquema fatorial 8 x 2 (meios de cultura x regimes de luz), com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT (SILVA & AZEVEDO, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Esporulação *in vitro*

Nos tratamentos testados ocorreram diferenças significativas com relação à esporulação de *D. tritici-repentis* (Tabela 1). A interação entre meios de cultura e técnicas foi significativa ($p < 0,05$).

Verificou-se que a maior esporulação do fungo, ocorreu no meio de cultura à base de suco V8, diferindo significativamente dos demais substratos. Neste substrato foram produzidos 9.943,16 conídios/cm² quando submetido à Técnica 1.

Os resultados corroboram àqueles obtidos por Moschen et al. (2008), em trabalho conduzido com diferentes meios de cultura visando a esporulação de *D. tritici-repentis*, onde o meio de cultura suco V8 destacou-se dos demais substratos comparados. Outros autores também descrevem o meio V8 como sendo adequado para a produção de esporos do fungo (HUNGER & BROWN, 1987; KRAN, 1971; PLATT et al., 1977).

O meio a base de suco V8 propicia o crescimento micelial e a esporulação de vários fungos (KRUPINSKY, 1982; PIANA & PRESTES, 1993; FERNANDES & SANTOS, 1996), inclusive para os de difícil esporulação como *D. tritici-repentis*.

Na Técnica 1, os substratos compostos de Alimento infantil, extrato de folha de trigo e suco de tomate, não diferiram significativamente entre si quanto à esporulação. Os meios de cultura a base de farinha de trigo, farinha de centeio e BDA, apresentaram as menores produções de esporos.

Na Técnica 2, o meio de cultura V8 também destacou-se dos demais substratos comparados. Nos meios de cultura alimento infantil, farinha de trigo, farinha de centeio, BDA e extrato de folha ocorreu baixa esporulação e em quantidade insatisfatória para condução de trabalhos de pesquisa em que se necessita produção de inóculo em larga escala. A menor produção de esporos foi observada no meio composto de farinha de trigo, onde determinou-se 108,68 esporos/cm². Observou-se a produção de esporos em todos os substratos analisados. De acordo com Dhingra & Sinclair (1985), alguns meios de cultura são mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros, por apresentarem carboidratos complexos que são

menos adequados para a produção de hifas vegetativas, porém mais adequados à produção de esporos.

Nota-se que, na comparação das técnicas, que na Técnica 1 onde as colônias foram submetidas a estresse pela raspagem do micélio com auxílio de um tubo de ensaio na presença de água, foi a que resultou na maior quantidade de conídios produzidos. A presença da água foi um fator favorável a esporulação. Nos meios de farinha integral de trigo, farinha integral de centeio e BDA obteve-se a menor esporulação nas duas técnicas. O meio BDA estimulou a formação de pequena quantidade de conidióforos e houve o menor crescimento radial das colônias. Já, nos meios farinha de trigo e farinha de centeio, praticamente não houve formação destas estruturas. Neste estudo verificou-se que os meios BDA e, os derivados de farinha, estimularam abundante formação de micélio, justificando a baixa produção de conídios.

A esporulação e morfologia de conídios do gênero *Drechslera*, são influenciados pelo substrato, idade da cultura, luz, aeração, temperatura e umidade (BRAVERMAN & GRAHAM, 1960; KAFI & TARR, 1966; RUPPEL, 1974; SHOEMAKER, 1962; TARR & KAFI, 1968).

Brunelli et al. (2007), trabalhando com o efeito de diferentes meios de cultura na esporulação de *Cercospora zeaemaydis* Tehon & E.Y. Daniels, constataram que o meio V8 e Suco de tomate induziram a formação de grande quantidade de conídios. Em estudos conduzidos com *Corynespora cassiicola* Berk. & Curtis por Almeida & Yamashita (1976), a melhor esporulação do fungo também foi observada no meio suco V8-Ágar.

Queiroz et al. (2004) avaliando meios de cultura para produção de esporos de *Alternaria brasiliensis* Queiroz, Muniz & Menezes, também citam o meio V8 como sendo o mais apropriado para o patógeno, demonstrando que meios de cultura contendo na sua composição, extratos e sucos oriundos de folhas ou de partes vegetais normalmente estimulam o crescimento micelial e a esporulação de vários fungos (DHINGRA & SINCLAR, 1985).

O meio V8 apresenta maior riqueza nutricional e maior quantidade de carboidratos complexos. Estas características são citadas por diversos autores como capazes de induzir a reprodução de muitos fungos mitospóricos (LUKENS, 1963; STRANDBERG, 1987).

Tabela 1. Esporulação (esporos/cm²) de *Drechslera tritici-repentis* em sete meios de cultura quando submetidas a duas técnicas de indução da esporulação

| Meios/Técnicas | Água | | Média |
|------------------------|--|--------------|----------|
| | Técnica 1 | Técnica 2 | |
| Alimento infantil | ^x A 2.090,72 b ^y | B 579,72 c | 1.335,22 |
| BDA | A 381,55 c | A 661,23 c | 521,39 |
| Extrato folha de trigo | A 2.597,90 b | B 1.096,97c | 1.847,44 |
| Farinha de centeio | A 409,45 c | A 586,86 c | 498,16 |
| Farinha de trigo | A 66,54 c | A 108,68 d | 87,61 |
| Suco de tomate | A 2.591,91 b | A 2.309,80 b | 2.450,86 |
| Suco V8-Ágar | A 9.943,16 a | B 7.286,68 a | 8.614,92 |
| Média | A 2.583,03 | B 1.804,27 | |
| CV % | 14,07 | | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. ^xLetras maiúsculas representam diferenças entre técnicas. ^yLetras minúsculas representam diferenças entre meios de cultura. Análise conjunta dos dados de dois experimentos.

Nos substratos farinha de centeio e alimento infantil, ocorreu maior diâmetro de colônias, independente da técnica adotada.

No meio de cultura BDA, ocorreu o menor crescimento vegetativo nas duas técnicas a que foi submetido, bem como, o meio V8 na Técnica 2. No meio BDA, o fungo apresentou resultados pouco satisfatórios tanto em relação ao crescimento quanto a esporulação (Tabela 2).

Nota-se pelos resultados obtidos no experimento, que o melhor meio para o crescimento radial das colônias, não proporcionou também a melhor esporulação do fungo. Cochrane (1958) relata que nem sempre há relação direta entre crescimento e produção de esporos e vice-versa. Às vezes, um meio ótimo para o crescimento rápido resulta na exaustão dos nutrientes e os metabólitos secundários liberados pelo fungo nesse meio, inibem a produção de esporos. Por outro lado, o crescimento miceliano reduzido pode estimular a esporulação naquele substrato (GRIFFIN, 1994).

No presente estudo foi verificada a alta produção de conídios, aliada ao baixo crescimento vegetativo, demonstrando não haver relação entre crescimento e esporulação.

Tabela 2. Diâmetro miceliano de colônias (mm/placa) de *Drechslera tritici-repentis*, em sete meios de cultura, submetidas a duas técnicas de indução da esporulação

| Meios/Técnicas | Água | | Média |
|------------------------|-------------------------------------|------------|-------|
| | Técnica 1 | Técnica 2 | |
| Alimento infantil | ^x A 60,33 a ^y | A 58,65 a | 59,50 |
| BDA | A 32,06 e | A 33,34 e | 32,71 |
| Extrato folha de trigo | A 56,07 bc | A 54,93 b | 55,50 |
| Farinha de centeio | A 56,76 ab | A 55,98 ab | 56,37 |
| Farinha de trigo | A 52,38 c | A 50,41 c | 51,40 |
| Suco de tomate | A 38,34 d | A 39,14 d | 38,75 |
| Suco V8-Ágar | A 38,80 d | B 35,96 e | 37,38 |
| Média | A 47,82 | A 46,92 | |
| CV % | 1,59 | | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. ^xLetras maiúsculas representam diferenças entre técnicas. ^yLetras minúsculas representam diferenças entre meios de cultura. Análise conjunta dos dados de dois experimentos.

3.2. Crescimento miceliano *in vitro*

Os resultados do crescimento miceliano de *D. tritici-repentis*, determinado pelo diâmetro da colônia, em oito meios de cultura, quando submetidos aos dois regimes de luminosidade constam na Tabela 3.

Houve efeito significativo do substrato de cultivo do fungo sobre o crescimento radial das colônias quando submetidas à fotoperíodo de 12 horas e escuro. Para o crescimento miceliano, a interação entre meios de cultura e regimes de luz foi significativa.

Os melhores resultados para o crescimento miceliano ocorreu nos substratos alimento infantil, suco de tomate, extrato de malte, extrato de folha de trigo e BDA pré-fabricado, independente do

regime luminoso a que os tratamentos foram expostos, bem como, para o substrato farinha de trigo no tratamento com escuro.

Valores inferiores de crescimento foram observados para o meio BDA, em ambos os regimes de luz empregados, o que pode ser explicado pela sua composição ser pobre em nutrientes que desfavorecem o desenvolvimento do fungo. A luz estimula a reprodução assexuada e sexual na maioria dos fungos, e seu efeito está intimamente relacionado à nutrição e à temperatura (LEACH, 1962).

Tabela 3. Crescimento miceliano (mm/placa) de *Drechslera tritici-repentis* em diferentes substratos sólidos e dois regimes luminosos

| Meios/Técnicas | Regime de luz | | Média |
|------------------------|-------------------------------------|-----------|---------|
| | Fotoperíodo (12h) | Escuro | |
| Alimento infantil | ^x A 81,60 a ^y | A 81,60 a | 81,60 a |
| BDA | B 28,65 d | A 36,01 c | 32,33 d |
| BDA pré-fabricado | A 78,75 a | A 81,60 a | 80,18 a |
| Extrato de malte | A 81,60 a | A 81,60 a | 81,60 a |
| Extrato folha de trigo | A 81,60 a | A 81,60 a | 81,60 a |
| Farinha de trigo | B 71,43 b | A 76,54 a | 73,98 b |
| Suco de tomate | A 79,50 a | A 78,57 a | 79,03 a |
| Suco V8-Ágar | A 55,62 c | A 52,40 b | 54,01 c |
| Média | A 69,84 | A 71,24 | |
| CV % | 5,10 | | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. ^xLetras maiúsculas representam diferenças entre regimes de luminosidade. ^yLetras minúsculas representam diferenças entre meios de cultura. Análise conjunta dos dados de dois experimentos.

O conhecimento da influência dos substratos artificiais no crescimento micelial de *D. tritici-repentis* é fundamental para a condução de estudos *in vitro* de fungitoxicidade. Em estudo de

sensibilidade *in vitro* de *D. tritici-repentis*, Beard et al. (2009), utilizaram em seu trabalho o meio composto de extrato de malte e ausência de luz, sendo considerado meio apropriado conforme resultados obtidos neste trabalho.

4 CONCLUSÕES

A maior esporulação de *D. tritici-repentis* ocorre no meio de cultura contendo suco V8-ágar associado à técnica do estresse do micélio na presença de água.

A esporulação de *D. tritici-repentis* é influenciada pela composição do meio de cultura e técnica adotada.

A esporulação do fungo não é diretamente proporcional ao crescimento miceliano das colônias.

O meio de cultura BDA não mostra resultados satisfatórios para crescimento miceliano e produção de esporos.

Para crescimento miceliano, os meios BDA pré-fabricado e extrato de folha de trigo, mostraram-se promissores para condução de testes de fungitoxicidade pelo seu baixo custo, características de colônia e praticidade.

CAPÍTULO III

REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE MICELIANA DE *Drechslera tritici-repentis*, ISOLADOS DO TRIGO, A FUNGICIDAS TRIAZÓIS, *IN VITRO*

ROSANE B. TONIN¹ & ERLEI MELO REIS²

RESUMO – A mancha-amarela da folha do trigo não tem sido controlada satisfatoriamente com os fungicidas tradicionalmente indicados pela pesquisa. Procurou-se esclarecer o fato, por meio da determinação da sensibilidade miceliana de cinco isolados de *Drechslera tritici-repentis* do trigo, aos fungicidas inibidores da desmetilação (IDMs). A concentração inibitória (CI₅₀) foi determinada para cinco fungicidas IDMs: ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol, protioconazol e tebuconazol. Sete concentrações foram testadas no bioensaio: 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 20,00 e 40,00 mg/L de ingrediente ativo (i.a.), suplementadas ao meio agarizado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados da porcentagem de inibição do crescimento miceliano, foram submetidos à análise de regressão logarítmica e calculada a CI₅₀. A redução da sensibilidade foi observada para o ingrediente ativo ciproconazol, para os cinco isolados. A CI₅₀ para o

¹Eng. Agr., M. Sc., doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. rosanetonin@yahoo.com.br

²Orientador, Eng. Agr., Ph.D., professor da FAMV/PPGAgro/UPF erleireis@tpo.com.br

epoxiconazol situou-se entre 0,35 a 1,37 mg/L, para o propiconazol de 0,49 a 1,28 mg/L e de 1,41 a 2,34 mg/L para tebuconazol. O prothioconazol mostrou-se o mais potente, com CI_{50} entre 0,09 a 0,21 mg/L. Confirmou-se a hipótese de que a falha de controle químico pode ser atribuída a redução da sensibilidade de Dtr aos fungicidas IDMs.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, mancha-amarela, fungitoxicidade, CI_{50} .

***IN VITRO* MYCELIAL SENSITIVITY REDUCTION OF
Drechslera tritici-repentis, ISOLATED FROM WHEAT, TO
TRIAZOLE FUNGICIDES**

ABSTRACT - The wheat yellow leaf spot caused by *Drechslera tritici-repentis* (Dtr), causes high damage in the crop. In recent seasons, producers and farm advisers observed control failure with fungicides traditionally effective for the disease control. The objective of this work was clarify the fact, by determining the mycelial sensitivity of five Dtr isolates to demethylation inhibitors (DMIs) fungicides. The inhibitory concentration (IC_{50}) was determined for five DMIs fungicides: cyproconazole, epoxiconazole, propiconazole, prothioconazole and tebuconazole. Seven concentrations of each fungicide were tested: 0.00, 0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 20.00 and 40.00 mg/L water of active ingredient (ai) supplemented to the agar medium. The experimental design was a completely randomized with four replications. The mycelial percent inhibition data were analyzed

by logarithmic regression and the IC_{50} calculated. The reduction of sensitivity was showed for cyproconazole for the five isolates. The IC_{50} for epoxiconazole was between 0.35 to 1.37 mg/L, propiconazole 0.49 to 1.28 mg/L, and from 1.41 to 2.34 mg/L for tebuconazole. The prothioconazole was the most potent, with IC_{50} between 0.09 to 0.21 mg/L. This findings confirmed the hypothesis that the control failure can be attributed to Dtr sensitivity reduction to DMI fungicides.

Keywords: *Triticum aestivum*, yellow leaf spot, fungitoxicity, IC_{50} .

1 INTRODUÇÃO

Na cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.), ocorrem doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. Das doenças fúngicas destacam-se as manchas foliares, podridões radiculares, oídio e as ferrugens (WIESE, 1977). As principais manchas foliares do trigo, na região sul do Brasil, são a mancha-amarela da folha, causada por *D. tritici-repentis*, a mancha marrom causada por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. e a septoriose, causada por *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ. (REUNIÃO, 2011).

Dentre as doenças de origem fúngica, a mancha foliar de ocorrência mais freqüente é a mancha-amarela (MAF) do trigo que tem sido considerada de difícil controle.

A MAF é causada por *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (anamorfo: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem. (HOSFORD, 1971). Os danos causados por esta doença podem atingir de 13 a 48 % (REES & PLATZ, 1983). O dano causado pelas manchas foliares em trigo pode ser estimado pela função normalizada $R = 1.000 - 5,7 I$ (R= rendimento de grãos e I= incidência foliar da doença) (REUNIÃO, 2011).

As medidas de controle integrantes do manejo integrado incluem, o uso de sementes saudáveis, o tratamento de sementes, a rotação de culturas e o controle químico em órgãos aéreos (REUNIÃO, 2011). O uso de variedades resistentes é uma medida de controle preferencial, no entanto, no Brasil ainda não existem cultivares com resistência suficiente para controlar a MAF do trigo (REIS et al., 1997).

Por isso, como medida complementar de controle, os fungicidas são importantes ferramentas para o controle das principais doenças das plantas em sistemas intensivos de produção (BRENT & HOLLomon, 1998). No entanto, seu uso constante pode promover a seleção de linhagens dos fungos resistentes, colocando em risco a eficiência do controle (DEKKER, 1995).

A detecção da ocorrência da redução da sensibilidade pode ser feita pela comparação de dados da sensibilidade entre populações de fungos resistentes e sensíveis (GEORGOPOULOS, 1982). Poucos estudos referentes ao monitoramento da sensibilidade de *D. tritici-repentis* a fungicidas recomendados pela pesquisa no controle da doença do trigo têm sido realizados.

Dois grupos de fungicidas são utilizados no controle de doenças de parte aérea do trigo, os triazóis e as estrobilurinas. Dentre os fungicidas do grupo químico dos triazóis ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol e tebuconazol são intensivamente utilizados pelos agricultores no controle do patógeno e recomendados pela pesquisa o seu uso isolado ou, em mistura (REUNIÃO, 2011). O fungicida propiconazol foi usado pela primeira vez em trigo na safra agrícola de 1986 (REUNIÃO, 1985), o tebuconazol na safra de 1991 (REUNIÃO, 1990), o ciproconazol na safra de 1993 (REUNIÃO, 1992) e o epoxiconazol na safra de 2000 (REUNIÃO, 1999). Após quinze anos de uso dos triazóis, em trigo surgiram às primeiras reclamações da falha de controle da ferrugem da folha, causada por *Puccinia triticina* Eriks (ARDUIM et al., 2009).

A partir da safra 2005/06 produtores e técnicos tem observado e reclamado da falha de controle da MAF em diversas

lavouras de trigo onde usavam IDMs isoladamente. Em face desse fato, formulou-se a hipótese de que a ineficiência de controle poderia ser atribuída à ocorrência da alteração da sensibilidade de *D. tritici-repentis* aos fungicidas.

Os objetivos desse trabalho foram determinar, *in vitro*, a CI₅₀ miceliana de *D. tritici-repentis*, isolados de trigo, aos fungicidas IDMs utilizados no controle da doença; comparar a potência dos fungicidas e da sensibilidade de isolados; e usar o fator de redução da sensibilidade como medida do grau de redução da sensibilidade do fungo aos fungicidas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia – Micologia, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS.

Para avaliar a sensibilidade miceliana de *D. tritici-repentis* a fungicidas, foi usado o método de incorporação de fungicidas ao meio de cultura fundente, como proposto por Russel (2004).

2.1 Isolados de *Drechslera tritici-repentis*

As cepas do fungo, utilizados nos ensaios, foram obtidas por isolamento a partir de folhas com sintomas da doença, provenientes de lavouras de trigo dos estados do Paraná e do Rio Grande do Sul.

Os isolados monospóricos, selecionados para o estudo, foram preservadas em tubo de ensaio com meio BDA (Marca MERCK 39 g/L), em refrigerador à temperatura de 5 °C. No trabalho foram utilizados cinco isolados de *D. tritici-repentis* (Tabela 1).

Tabela 1. Origem e identificação dos isolados de *Drechslera tritici-repentis*

| Isolado | Cultivar | Local | Designação |
|---------|-----------|-------------------------|------------|
| 01 | Quartzo | Ventania – PR | 01/QTZ |
| 02 | Onix | Santo Augusto – RS | 02/ONX |
| 03 | Horizonte | Júlio de Castilhos – RS | 03/HZT |
| 04 | Guamirim | Coxilha – RS | 04/GUA |
| 05 | CD 104 | Pitangueiras – PR | 05/CD |

2.2 Fungicidas

No ensaio, utilizou-se cinco fungicidas pertencentes ao grupo químico dos triazóis: ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol, protioconazol e tebuconazol (Tabela 2).

Esses fungicidas são recomendados (mistura de IDM mais IQE) para o controle da MAF na cultura do trigo (REUNIÃO, 2011). Um fungicida novo, o protioconazol, foi utilizado para comparar o seu desempenho com os tradicionalmente usados.

Tabela 2. Fungicidas utilizados para determinar a sensibilidade, *in vitro*, de isolados de *Drechslera tritici-repentis*

| Produto Técnico | Formulação comercial | Ingrediente ativo (g/L) | Grupo Químico |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Ciproconazol | Alto 100 SL | 100 g/L | Triazol |
| Epoconazol | Opus SC | 125 g/L | Triazol |
| Propiconazol | Tilt EC | 250 g/L | Triazol |
| Protioconazol | Proline EC | 250 g/L | Triazolinthione |
| Tebuconazol | Folicur 200 EC | 200 g/L | Triazol |

Fonte: AGROFIT

2.3 Determinação *in vitro* da sensibilidade miceliana de *Drechslera tritici-repentis* a fungicidas

Nos ensaios foram testadas sete concentrações: 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 20,00 e 40,00 mg/L de ingrediente ativo (i.a.) de cada fungicida. A concentração 0,00 mg/L, ou ausência de fungicida representou a testemunha de cada experimento.

Para o preparo das suspensões, alíquotas de fungicidas, foram transferidos com o auxílio de um micropipetador para balão volumétrico contendo água destilada e esterilizada (ADE), resultando em um volume final de 100 mL (suspensão base 1). Desta primeira suspensão fungicida transferiu-se 1 mL para 99,0 mL de ADE para outro balão volumétrico, constituindo a segunda diluição (solução base 2).

Após o preparo das suspensões, acrescentou-se os volumes necessários ao meio de extrato de folhas de trigo (3g de folha de trigo, 20 g de BDA, 8 g de ágar e 1L de água destilada), para obter as

concentrações desejadas. Os frascos foram cuidadosamente agitados e o meio vertido em placas de Petri (tamanho 90 x 15 mm) previamente esterelizadas, em câmara de fluxo laminar em condições assépticas.

Para as placas de Petri contendo substrato suplementado com as concentrações dos fungicidas, transferiu-se discos contendo micélio do fungo, com 5 mm de diâmetro, retirados da borda de colônias com sete dias de crescimento. As placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, proporcionado por três lâmpadas fluorescentes, 40 W, posicionados a 50 cm acima das placas e, distribuídas ao acaso em prateleiras.

2.4 Avaliação

A avaliação foi efetuada através da medição, com um paquímetro digital (marca Mitutoyo), do crescimento radial das colônias, em dois raios perpendiculares, quando o crescimento do fungo, no tratamento testemunha, atingiu à borda da placa.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (fungicidas x isolados) com quatro repetições, cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri. Os experimentos foram realizados duas vezes utilizando-se na análise estatística a média dos dois ensaios.

Os dados do crescimento miceliano, em milímetros, foi convertido para percentagem e submetidos à análise de regressão logarítmica e calculada a concentração que inibe 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) utilizando-se o programa estatístico Costat. A CI_{50} do crescimento miceliano foi calculada pela equação gerada.

Para detectar a alteração da sensibilidade do fungo a fungicidas, a ferramenta utilizada foi o fator de redução de sensibilidade (FRS). O FRS é calculado pelo valor da CI_{50} da linhagem suspeita/ pela CI_{50} da linhagem sensível. Quando o valor do FRS foi igual a 1, não ocorreu alteração na sensibilidade e havendo será > 1 .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à fungitoxicidade de ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol, protioconazol e tebuconazol, encontram-se na Tabela 3 e representados graficamente nas Figuras 1 a 5. Nota-se que nenhum tratamento fungicida inibiu 100% o crescimento miceliano do fungo, nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0 mg/L (Figuras 1 a 5).

A sensibilidade dos isolados foi classificada tomando-se como padrão os critérios de Edgington et al. (1971). No presente trabalho foi adaptada, segundo os seguintes atributos: insensíveis se a $CI_{50} > 40$ mg/L; baixa sensibilidade se a CI_{50} estiver entre 10 e 40 mg/L; moderadamente sensíveis se a CI_{50} estiver entre 1 e 10 mg/L; altamente sensíveis se a $CI_{50} < 1$ mg/L, sendo CI_{50} definido como a concentração do ingrediente ativo capaz de inibir em 50% do crescimento miceliano do isolado.

Na média dos dois experimentos, o Isolado 01/QTZ apresentou coeficiente de determinação (R^2) entre 0,91 a 0,98 e CI_{50} de 0,18 a > 40 mg/L (Tabela 1 do Apêndice 1). Este isolado foi considerado sensível de acordo com a classificação proposta,

apresentando valores de CI_{50} menores que 1,0 mg/L, para os fungicidas propiconazol e protioconazol. Os valores de CI_{50} situaram-se entre 0,86 mg/L para propiconazol e 0,18 mg/L para protioconazol. O isolado foi considerado moderadamente sensível para os fungicidas epoxiconazol, apresentando valores de CI_{50} 1,37 mg/L e tebuconazol 1,84 mg/L. O isolado foi considerado insensível para o ingrediente ativo ciproconazol, com valor da $CI_{50} > 40$ mg/L (Figura 1).

Analisando a sensibilidade do isolado 02/ONX o coeficiente de determinação (R^2) variou de 0,89 a 0,96 e a CI_{50} de 0,16 a 28,11 mg/L (Tabela 2 do Apêndice 2). O isolado mostrou-se altamente sensível aos ingredientes ativos epoxiconazol e protioconazol. Valores de CI_{50} variaram de 0,35 mg/L para o epoxiconazol a 0,16 mg/L para o protioconazol. Valores superiores a 1,0 mg/L foram verificados para propiconazol 1,28 mg/L e tebuconazol 2,34 mg/L, sendo o isolado considerado como moderadamente sensível para estes ingredientes ativos e classificado como de baixa sensibilidade para ciproconazol com valor de CI_{50} de 28,11 mg/L.

Os valores referentes à CI_{50} para o Isolado 03/HTZ variaram de 0,21 a > 40 mg/L. O coeficiente de determinação (R^2) situou-se entre 0,81 a 0,99 (Tabela 3 do Apêndice 3). Esse isolado classificou-se como insensível ao ciproconazol com valor de $CI_{50} > 40$ mg/L, evidenciando a redução/perda da sensibilidade a este fungicida. Resultados semelhantes também foram encontrados para os demais isolados. Valores de CI_{50} situaram-se entre 0,49 mg/L para propiconazol e 0,21 mg/L para protioconazol. O isolado foi

considerado moderadamente sensível para os fungicidas epoxiconazol (1,11 mg/L) e tebuconazol (1,82 mg/L) (Figura 2 e 5).

O isolado 04/GUA apresentou coeficiente de determinação (R^2) entre 0,90 a 0,98 e valor de $CI_{50} < 1$ mg/L para epoxiconazol 0,63 mg/L, propiconazol 0,50 mg/L e protioconazol 0,09 mg/L, sendo considerado sensível a esses fungicidas (Tabela 4 do Apêndice 4). Observa-se crescimento radial das colônias do fungo em todas as concentrações avaliadas para o epoxiconazol e até a concentração de 20 mg/L para propiconazol (Figura 2 e 3). Na concentração de 10 mg/L a inibição do crescimento miceliano foi de 100% para protioconazol (Figura 4). O isolado foi considerado moderadamente sensível para tebuconazol apresentando valores de CI_{50} 1,41 mg/L. O isolado foi considerado insensível para o ingrediente ativo ciproconazol com valor de $CI_{50} > 40$ mg/L (Figura 1).

Quanto ao coeficiente de determinação (R^2) para o isolado 05/CD valores situaram-se entre 0,92 a 0,98 (Tabela 5 do Apêndice 5). Valores da CI_{50} variaram de 0,17 a 34,08 mg/L para os cinco fungicidas. O isolado foi considerado sensível apresentando valores menores que 1mg/L para o epoxiconazol (0,45 mg/L) e o protioconazol (0,17 mg/L). Valores superiores a 1,0 mg/L foram verificados para propiconazol, tebuconazol e ciproconazol. Valores obtidos da CI_{50} foram de 1,17 mg/L (propiconazol) e 2,21 mg/L (tebuconazol), sendo o isolado considerado moderadamente sensível para estes ingredientes ativos. Verificou-se baixa sensibilidade a ciproconazol com valor de CI_{50} 34,08 mg/L, respectivamente.

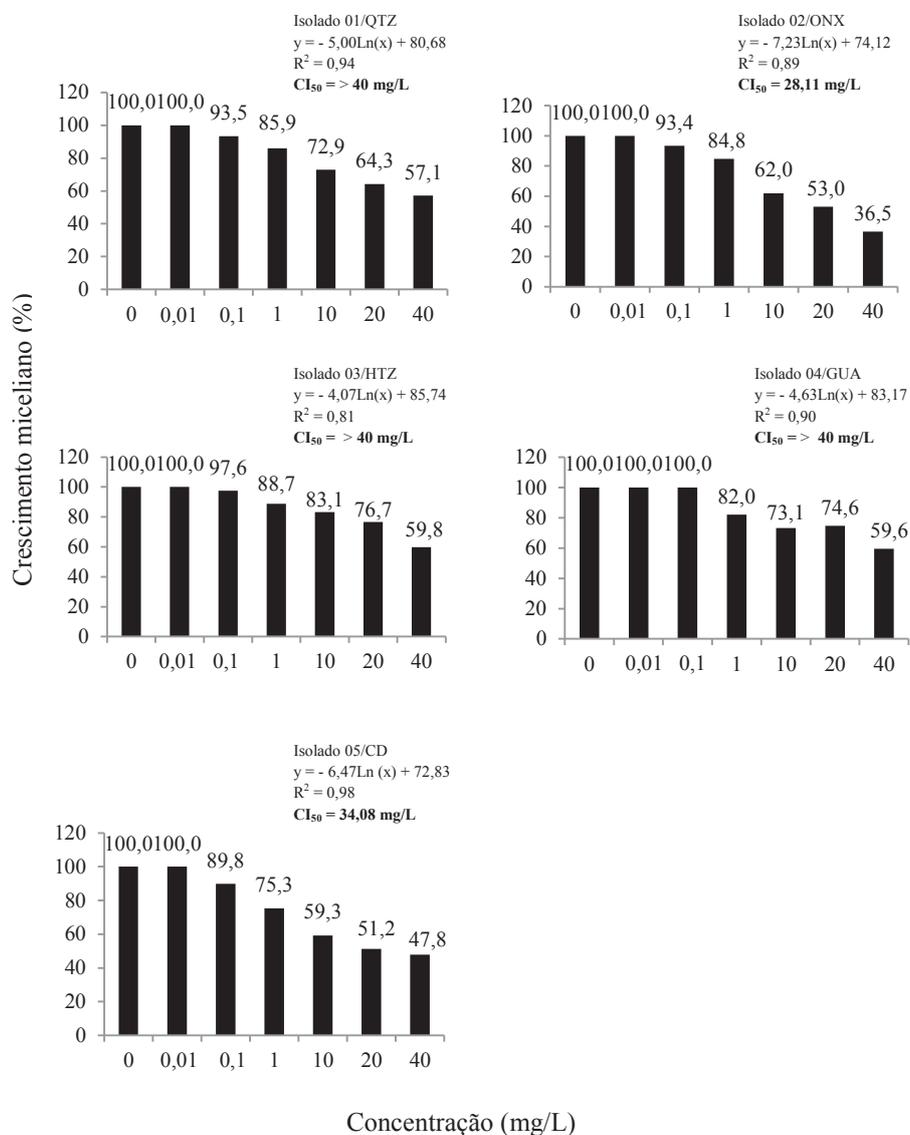


Figura 1. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera tritici-repentis*, isolados de trigo, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol.

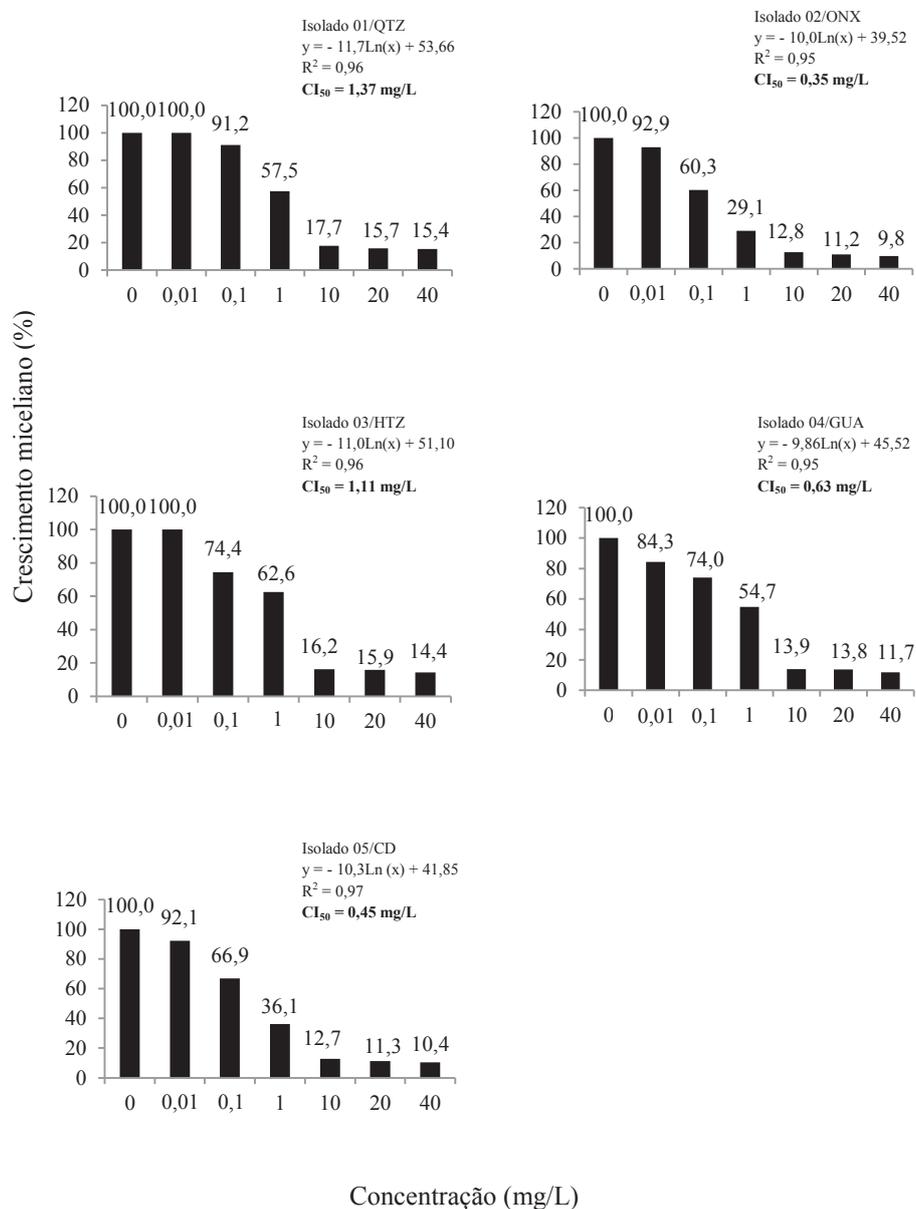


Figura 2. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera tritici-repentis*, isolados de trigo, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol.

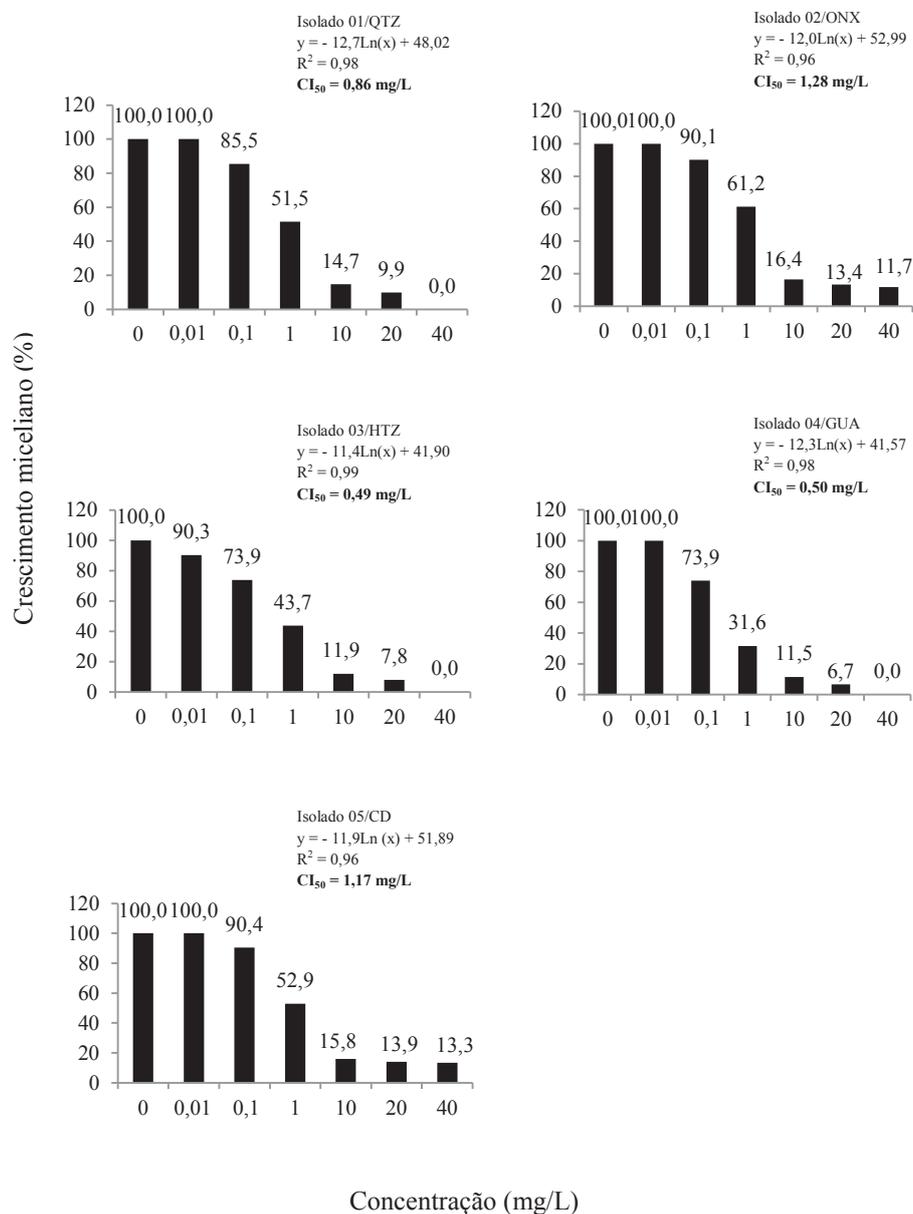


Figura 3. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera tritici-repentis*, isolados de trigo, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida propiconazol.

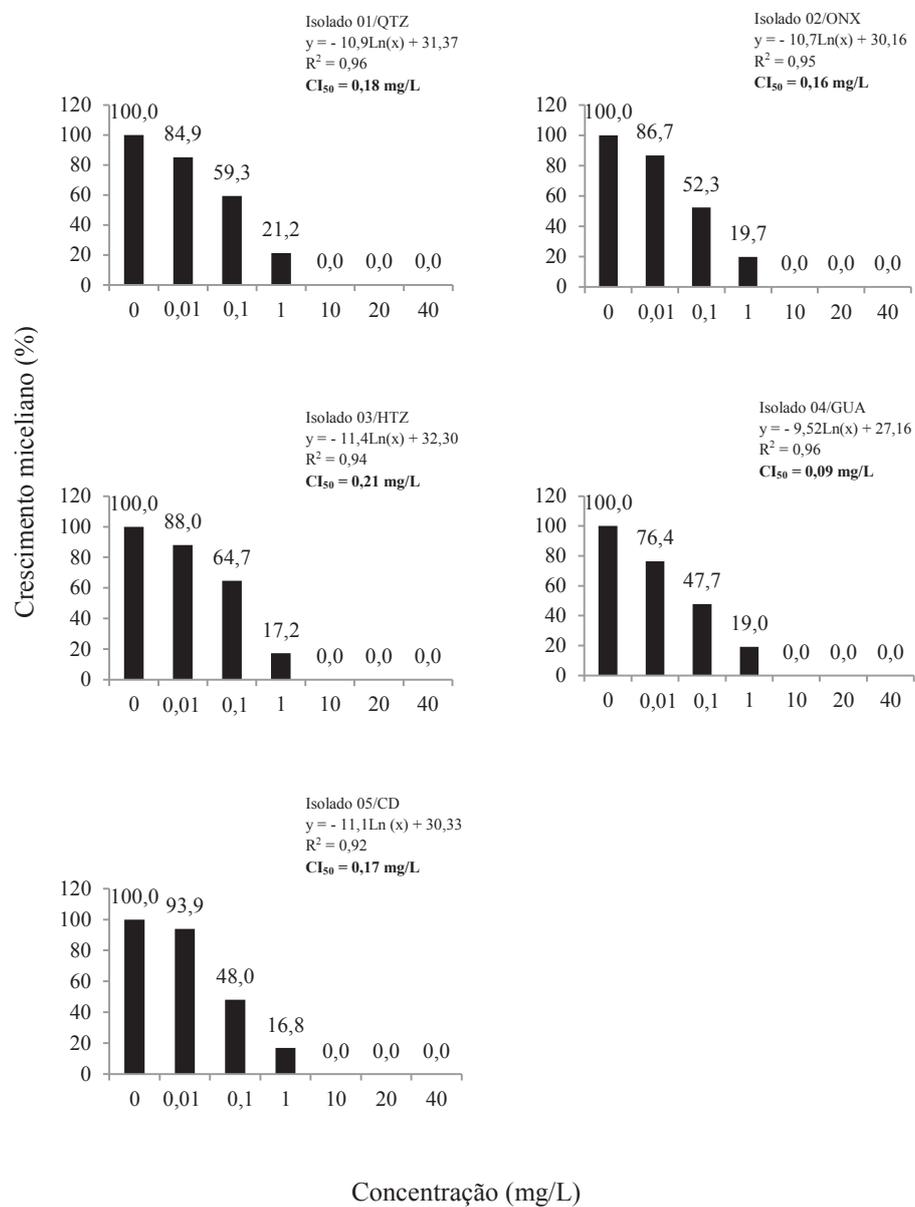


Figura 4. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera tritici-repentis*, isolados de trigo, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida prothioconazol.

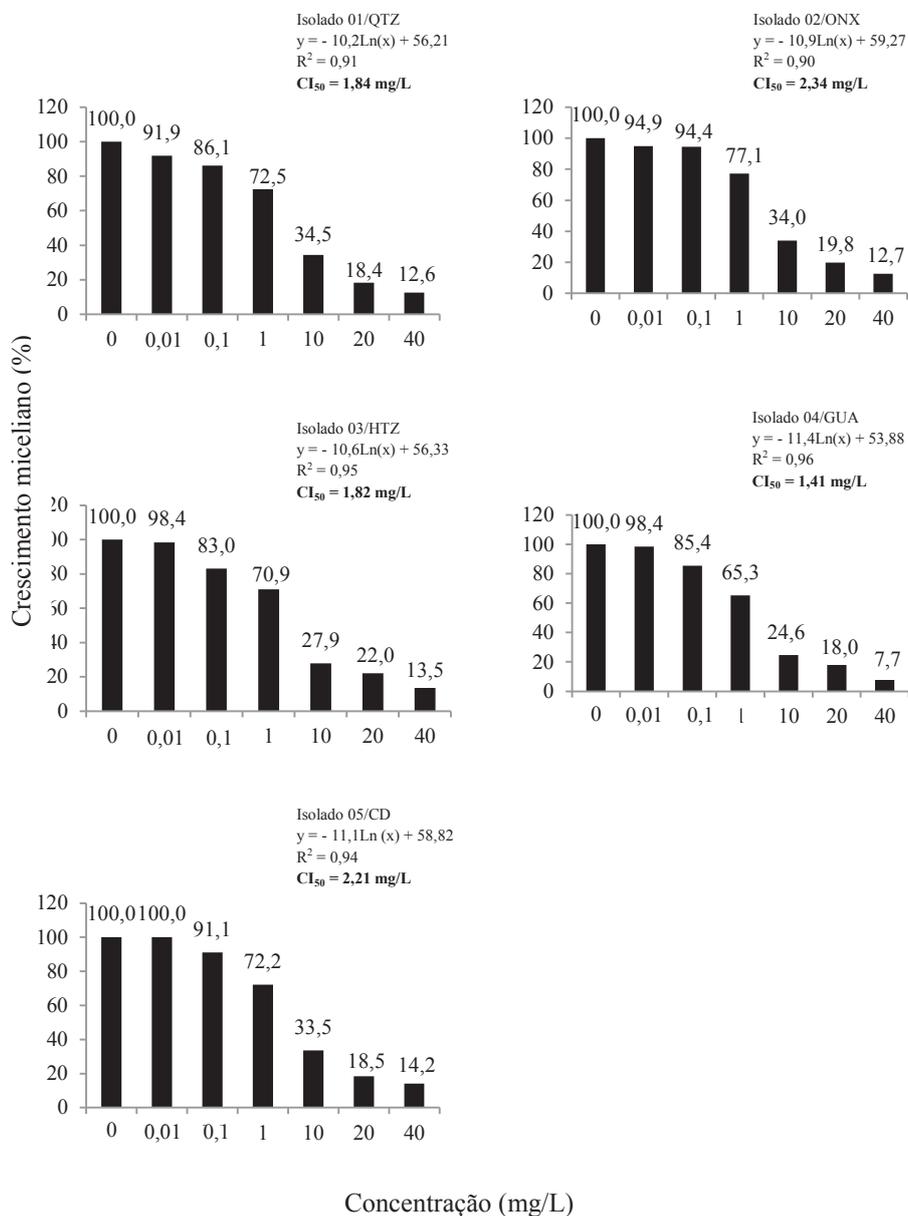


Figura 5. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera tritici-repentis*, isolados de trigo, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol.

A interação entre os isolados e os fungicidas foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 3). Entre os cinco fungicidas IDMs testados *in vitro*, protioconazol apresentou os menores valores de CI_{50} para os cinco isolados, mostrando a maior eficiência na inibição do crescimento miceliano de *D. tritici-repentis*. Os valores encontrados variaram entre 0,09 a 0,21 mg/L (Tabela 3). Na concentração de 10 mg/L a inibição do crescimento miceliano foi de 100% para os cinco isolados (Figura 4).

Tabela 3. Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI₅₀) de fungicidas para cinco isolados de *Drechslera tritici-repentis* aos fungicidas inibidores da desmetilação

| Fungicida | Isolados | | | | | Média |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| | 01/QTZ | 02/ONX | 03/HZT | 04/GUA | 05/CD | |
| Ciproconazol | A > 40 a | C 28,11 a | A > 40 a | A > 40 a | B 34,08 a | >36,44 a |
| Epoxiconazol | A 1,37 bc | C 0,35 d | AB 1,11 c | BC 0,63 c | C 0,45 d | 0,78 c |
| Propiconazol | AB 0,86 c | A 1,28 c | B 0,49 cd | B 0,50 c | A 1,17 c | 0,86 c |
| Protioconazol | A 0,18 d | A 0,16 d | A 0,21d | A 0,09 c | A 0,17 d | 0,16 d |
| Tebuconazol | AB 1,84 b | A 2,34 b | AB 1,82 b | B 1,41b | A 2,21b | 1,94 b |
| Média | > 8,85 a | 6,45 d | > 8,72 ab | > 8,52 b | 7,42 c | |
| CV (%) | 2,77 | | | | | |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam médias na coluna e as minúsculas na linha. Médias de dois experimentos.

A menor CI_{50} foi determinada para o isolado 04/GUA para o protioconazol. Este fungicida foi considerado o mais fungitóxico apresentando valor de CI_{50} 0,09 mg/L, não diferindo estatisticamente do epoxiconazol e propiconazol. Na literatura consultada não se encontrou relatos da fungitoxicidade e valores de CI_{50} para *D. tritici-repentis*, na cultura do trigo, *in vitro*, ao protioconazol, porém, o mesmo mostra-se altamente promissor no controle da doença, conforme resultados obtidos no presente trabalho.

Observou-se que, os maiores valores de CI_{50} foram obtidas para o fungicida ciproconazol, com valores de CI_{50} entre 28,11 a > 40 mg/L, mostrando que os isolados foram menos sensíveis *in vitro* a esse fungicida. Ocorreu crescimento miceliano do fungo, expresso em diâmetro da colônia, em todas as concentrações testadas para os cinco isolados (Figura 1).

O ingrediente ativo tebuconazol foi classificado como moderadamente fungitóxico para todos os isolados avaliados, diferindo estatisticamente dos demais fungicidas exceto para o isolado 01/QTZ para epoxiconazol (Tabela 3). Não houve inibição de 100 % do desenvolvimento do fungo em nenhuma das concentrações (Figura 5).

Na comparação entre os isolados, observa-se que na média para os cinco fungicidas avaliados o Isolado 01/QTZ, oriundo de Ventania, PR, mostrou-se o menos sensível, não diferindo estatisticamente do 03/HTZ de Júlio de Castilhos, RS e o isolado 02/ONX procedente de Santo Augusto, RS apresentou-se o mais sensível (Tabela 3).

Considerando o Fator de Redução de Sensibilidade (FRS) (Tabela 4), observa-se redução da sensibilidade para os isolados em estudo. O fator de redução da sensibilidade (FRS) é uma ferramenta útil para quantificar a alteração da sensibilidade de um fungo a um fungicida (GHINI & KIMATI, 2000). Na média os valores do FRS situaram-se entre 1,36 a 2,23, ou seja, estes isolados requerem uma concentração do fungicida de 1,36 a 2,23 vezes maior para se obter uma redução de 50% do crescimento miceliano do fungo (Tabela 4).

Tabela 4. Fator de redução de sensibilidade (FRS) de isolados de trigo de *Drechslera tritici-repentis*, a fungicidas inibidores da desmetilação

| Fungicida | Isolados (FRS) | | | | | Média |
|---------------|----------------|--------|--------|--------|-------|-------|
| | 01/QTZ | 02/ONX | 03/HZT | 04/GUA | 05/CD | |
| Ciproconazol | -* | - | - | - | - | - |
| Epoxiconazol | 3,91 | 1,00 | 3,17 | 1,80 | 1,28 | 2,23 |
| Propiconazol | 1,75 | 2,61 | 1,00 | 1,02 | 2,38 | 1,75 |
| Protioconazol | 2,00 | 1,77 | 2,33 | 1,00 | 1,89 | 1,80 |
| Tebuconazol | 1,30 | 1,66 | 1,29 | 1,00 | 1,57 | 1,36 |
| Média | 2,24 | 1,61 | 1,95 | 1,20 | 1,66 | |

* Insensível

Estes resultados confirmam a hipótese de que a falha de controle da mancha amarela na cultura do trigo, observada nas últimas safras, pode ser atribuída à redução da sensibilidade do fungo aos fungicidas utilizados no controle da doença.

Na comparação da média entre os isolados, o isolado 01/QTZ, oriundo de Ventania/PR, apresentou o maior valor do FRS (2,24) e 04/GUA, de Coxilha/RS o menor valor 1,20, respectivamente.

Na média geral, o fungicida protioconazol foi o mais potente, seguido do epoxiconazol, do propiconazol e do tebuconazol (Tabela 3). Hunger & Brown (1987) trabalhando com isolados de *P. tritici-repentis*, oriundos do Canadá e E.U.A, coletados nas safras de 1982 a 1983, determinaram valores da EC₅₀ para o propiconazol de 0,04 mg/L e 0,19 mg/L para o tebuconazol. Os valores de CI₅₀ para o fungicida propiconazol encontrados neste trabalho variaram de 0,49 a 1,28 mg/L e tebuconazol entre 1,41 a 2,34 mg/L, respectivamente.

Stolte (2006), conduzindo ensaios de monitoramento da sensibilidade miceliana de *D. tritici-repentis*, isolados do trigo, oriundos da Argentina e Paraná, na safra 2005, obteve valores de CI₅₀ < 1mg/L para os fungicidas ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol e tebuconazol, sendo os isolados considerados sensíveis a esses ingredientes ativos.

Beard et al. (2009) em estudo conduzido com *P. tritici-repentis*, na Austrália, relata valores de CI₅₀ de 0,19 mg/L para o epoxiconazol, 0,39 mg/L para o propiconazol e 0,25 mg/L para o tebuconazol.

Os dados relatados por Stolte (2009) e Beard et al. (2009), para os fungicidas ciproconazol e tebuconazol, diferem dos obtidos neste trabalho, onde os valores de CI₅₀ foram superiores, esses resultados mostram que ocorreu redução da sensibilidade do fungo *D. tritici-repentis* aos triazóis.

Blixt et al. (2009), para *Phaeosphaeria nodorum* (E. Müll.) Hedjar., em trigo, avaliando diferentes isolados, relatam para o fungicida propiconazol valores de EC₅₀ entre 0,03 a 2,09 mg/L e entre 0,30 e 4,27 mg/L para protioconazol.

Vários fatores podem contribuir para o surgimento da redução da sensibilidade como o produto aplicado, intensidade de uso e a genética do fungo (ZAMBOLIM et al., 2007).

O uso de fungicida deve ser manejado em função de estratégias anti-resistência. Estas estratégias são baseadas no princípio de que quando há aplicação do fungicida, é exercida uma pressão de seleção sobre a população do patógeno, podendo, a longo ou curto prazo, dependendo de mecanismos genéticos envolvidos, resultar na seleção e predominância de indivíduos menos sensíveis na população do fungo alvo (GHINI & KIMATI, 2000).

Conforme os resultados obtidos no presente trabalho, constatou-se a redução de sensibilidade de *D.tritici-repentis*, para os fungicidas do grupo químico dos triazóis em grau diferente entre eles.

Os fungicidas testados neste trabalho pertencem ao mesmo grupo dos triazóis e, com o mesmo mecanismo de ação, IDM, porém, sua potência diferiu entre os representantes do grupo. Compara-se, na média geral para os cinco isolados, a potência do protioconazol com CI_{50} de 0,16 mg/L com a do ciproconazol, $CI_{50} > 36,44$ mg/L (Tabela 3). Por pertencerem ao mesmo grupo não é assegurado que apresentam fungitoxicidade igual.

4 CONCLUSÕES

O fungicida protioconazol mostrou-se o mais potente entre os triazóis, na inibição miceliana de *D. tritici-repentis*.

O ingrediente ativo ciproconazol, apresentou os maiores valores de CI_{50} entre os triazóis testados, sendo considerado o menos fungitóxico.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a redução da sensibilidade de alguns isolados de *D. tritici-repentis* para os triazóis.

CAPÍTULO IV

SENSIBILIDADE DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Drechslera tritici-repentis* A FUNGICIDAS IQE, *IN VITRO*

ROSANE B. TONIN¹ & ERLEI MELO REIS²

RESUMO – Devido a relatos da ocorrência de falha de controle químico à mancha-amarela objetivou-se determinar a sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* aos fungicidas inibidores da quinona externa (IQE), sobre a germinação de esporos. Os fungicidas foram incorporados no meio ágar-água, em diferentes concentrações 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 20,00 e 40,00 mg/L. Em cada placa de Petri foi depositada 350 µL da suspensão de conídios e mantidas em câmara incubadora tipo BOD, à 22 ± 1 °C, por oito horas. A CI₅₀ foi determinada para cinco fungicidas azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina. O ensaio constituiu-se de tratamentos inteiramente casualizados, com quatro repetições. Os experimentos foram realizados duas vezes utilizando-se para a análise estatística a sua média. Os dados da porcentagem da inibição da germinação de conídios foram submetidos à análise de regressão logarítmica, calculando-se a concentração inibitória de 50 % (CI₅₀) através da equação gerada. Foi verificada a perda da sensibilidade de

¹Eng. Agr., M. Sc., doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. rosanetonin@yahoo.com.br

²Orientador, Eng. Agr., Ph.D., professor da FAMV/PPGAgro/UPF - erleireis@tpo.com.br

isolados de *D. tritici-repentis* para os IQEs. Os dados mostraram variação quanto à fungitoxicidade dos ingredientes ativos, desde altamente fungitóxicos a atóxicos para os isolados de *D. tritici-repentis* testados. Valores da CI_{50} situaram-se entre 0,58 a > 40,00 mg/L. O fungicida piraclostrobina mostrou-se o mais eficiente, com CI_{50} entre 0,58 a 1,03 mg/L.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, fungitoxicidade, IQEs, mancha amarela, CI_{50} .

***IN VITRO* SENSITIVITY OF *Drechslera tritici-repentis*, SPORE GERMINATION, ISOLATED FROM WHEAT TO IQE FUNGICIDE**

ABSTRACT - Growers and farm adviser have report control failure of wheat leaf blights after continuous use of fungicides in the last wheat growing seasons. In Brazil there are few records of work done on the sensitivity of *Drechslera tritici-repentis* to fungicides. To explain the fact it necessary to determine the fungal sensitivity to quinone outside inhibitors (IQE) on spore germination. Water agar was supplemented with fungicides at different concentrations 0.00, 00.1, 0.10, 1.00, 10.00, 20.00 and 40.00 mg/L water. A 350 uL volume of spore suspension was poured in each petry dish and kept in a BOD incubator, at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ for eight hours. The IC_{50} was determined for five fungicide azoxystrobin, kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin and trifloxystrobin. The treatments were arranged in a complete randomized design with four replications. The

experiments were performed twice and for statistical analysis the means of the trials were used. The percent inhibition data of germination were subjected to logarithmic regression analysis, and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by the generated equation. Data showed variation in the fungitoxicity of the active ingredients from nontoxic to highly fungitoxic to *D. tritici-repentis* isolates. IC₅₀ values ranged from 0.58 to > 40.00 mg/L. The pyraclostrobin was the most efficient, with IC₅₀ ranging from 0.58 to 1, 03 mg/L.

Keywords: *Triticum aestivum*, fungitoxicity, IQEs, yellow spot, IC₅₀.

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (Anamorfo: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker, é o agente causal da mancha-amarela da folha (MAF) do trigo (HOSFORD, 1971). Esta doença tem sido uma ameaça à produção de trigo em muitos estados e países (HOSFORD, 1982). Danos de até 36% no rendimento da cultura do trigo foram atribuídas à MAF em avaliações no Paraná (MEHTA & GAUDÊNCIO, 1991). O dano causado ao trigo pelas manchas foliares pode ser estimado pela função normalizada $R = 1.000 - 5,7 I$ (R= rendimento de grãos e I= incidência foliar) (REUNIÃO, 2011).

A MAF foi predominante entre as doenças do trigo nas últimas safras. De acordo com Prestes et al. (2002), o fato está relacionado ao plantio direto e monocultura, uma vez que esse patógeno é um fungo necrotrófico e sobrevive em restos culturais na sua forma teleomórfica e em hospedeiros secundários. Além do trigo, o fungo ataca outras gramíneas (HOSFORD, 1982; KRUPINSKY, 1992), como o centeio (*Secale cereale*) e o triticales (*X. Triticosecale*).

O manejo integrado da MAF é feito pelo uso de cultivar resistente ou tolerante, semente sadia, tratamento de semente com fungicida eficiente, semeadura na época indicada, rotação de culturas e aplicação de fungicidas (REIS & CASA, 2007). A resistência genética é uma medida de controle muito importante, porém, no Brasil ainda não se dispõe de cultivares com resistência suficiente para controlar a mancha amarela do trigo (REUNIÃO, 2011).

O uso de fungicidas está entre um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, porém, seu uso repetido por muitas safras pode promover a seleção de linhagens de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida (GHINI & KIMATI, 2000). Atualmente, a menor sensibilidade vem sendo um dos mais importantes problemas do controle químico das doenças de plantas.

Poucos estudos do monitoramento da sensibilidade de *D. tritici-repentis* aos fungicidas recomendados pela pesquisa no controle do patógeno têm sido conduzidos. Dentre os fungicidas inibidores da quinona externa (IQE) a azoxistrobina, o cresoxim-metílico, a piraclostrobina e a trifloxistrobina são intensivamente utilizados pelos agricultores e recomendados pela pesquisa o uso em mistura com os fungicidas IDM para o controle do patógeno (REUNIÃO, 2011).

A sensibilidade de um fungo a um fungicida ou a fungitoxicidade da substância química é medida por parâmetros como a DE_{50} (dose efetiva ou eficaz que promove um efeito desejado em 50% dos microrganismos submetidos ao teste), DL_{50} (dose letal), CL_{50} (concentração letal), CI_{50} (concentração inibitória), CE_{50} (concentração efetiva), CMI (Concentração Mínima Inibitória), IC_{50} (inibição do crescimento) e CI_{50} (concentração inibitória que inibe em 50% o crescimento miceliano ou a germinação de esporos) (RUSSEL, 2004; SHARVELLE, 1961; TORGESON, 1967).

Uma substância química em função de suas características, inerentes à molécula química, apresenta fungitoxicidade. Por outro lado, um fungo, em função de suas características genéticas apresenta, ou não, sensibilidade a uma dada molécula. Se um fungo for sensível a

um fungicida, este apresenta fungitoxicidade; caso contrário, é atóxico. Se o fungicida não apresenta fungitoxicidade, o fungo é, então, considerado insensível (REIS et al., 2010).

A alteração da sensibilidade do patógeno a um determinado fungicida pode comprometer o controle químico (ARDUIM et al., 2007). Assim, o monitoramento da sensibilidade a fungicidas em uma população de patógenos, é importante para determinar a presença de isolados resistentes para manter a eficiência do controle.

Devido a relatos da ocorrência de resistência, após o uso contínuo de fungicidas para o controle de fungos, e visto que, no Brasil, há poucos registros de trabalhos desenvolvidos quanto à sensibilidade de *D. tritici-repentis* a fungicidas, em trigo, o objetivo do estudo foi determinar a sensibilidade do fungo aos fungicidas do grupo químico das estrobilurinas ou inibidores da quinona externa (IQEs), sobre a germinação de esporos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS.

2.1 Isolados de *Drechslera tritici-repentis*

A coleção de isolados do fungo *D. tritici-repentis* utilizados nos ensaios foi estabelecida a partir de isolamento de folhas

com sintomas da doença, provenientes de lavouras de trigo do estado do Paraná e Rio Grande do Sul (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos isolados de *Drechslera tritici-repentis*

| Isolado | Cultivar | Local | Designação |
|---------|-----------|-----------------------|------------|
| 01 | Quartzo | Ventania/PR | 01/QTZ |
| 02 | Onix | Santo Augusto/RS | 02/ONX |
| 03 | Horizonte | Júlio de Castilhos/RS | 03/HZT |
| 04 | Guamirim | Coxilha/RS | 04/GUA |
| 05 | CD 104 | Pitangueiras/PR | 05/CD |

2.2 Sensibilidade de conídios de *Drechslera tritici-repentis* a fungicidas, *in vitro*

No ensaio para a determinação da sensibilidade de conídios de isolados de *D. tritici-repentis*, utilizou-se cinco fungicidas inibidores da quinona externa (IQEs) azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina (Tabela 2).

Os fungicidas empregados nos bioensaios são recomendados (mistura de IDMs mais IQEs) para o controle da mancha-amarela na cultura do trigo, com exceção de picoxistrobina (REUNIÃO, 2011).

Tabela 2. Fungicidas IQE utilizados para determinar a sensibilidade de conídios, *in vitro*, a cinco isolados de *Drechslera tritici-repentis*

| Produto técnico | Formulação comercial | Ingrediente ativo (g/L) |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Azoxistrobina | Priori SC | 250 g/L |
| Cresoxim-metílico | Stroby SC | 500 g/L |
| Picoxistrobina | Oranis SC | 250 g/L |
| Piraclostrobina | Comet EC | 250 g/L |
| Trifloxistrobina | Twist CE | 125 g/L |

Fonte: AGROFIT

Para avaliar a sensibilidade da germinação de esporos de *D. tritici-repentis* a fungicidas, o bioensaio empregado foi o de incorporação de fungicidas ao meio de cultura fundente, semelhante ao método descrito por Russel (2004).

Para a obtenção da suspensão base, os fungicidas inicialmente foram solubilizados em água destilada e esterilizada para obter as concentrações desejadas. Sete concentrações de ingrediente ativo foram utilizadas no bioensaio 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 20,00 e 40,00 mg/L. A concentração 0,00 mg/L, ou ausência de fungicida representou a testemunha de cada experimento.

No preparo das suspensões, alíquotas dos fungicidas foram transferidos, com o auxílio de um micropipetador, para balões volumétricos contendo água destilada e esterilizada (ADE), resultando em um volume final de 100 mL (solução base). Desta primeira suspensão fungicida, transferiu-se 1 mL para 99,0 mL de ADE para outro balão volumétrico, constituindo a segunda diluição (solução base). Após o preparo das suspensões acrescentou-se os volumes

necessários ao meio de cultura ágar-água para que as concentrações desejadas fossem satisfeitas. Os frascos foram cuidadosamente agitados e o meio vertido em placas de Petri (tamanho 60 x 10 mm) plásticas esterilizadas, em câmara de fluxo laminar.

Suspensões de esporos de cada isolado de *D.tritici-repentis* foram preparadas utilizando colônias com abundante esporulação do patógeno, com sete dias de crescimento e, previamente cultivadas em meio de cultura V8. Os esporos foram removidos através da raspagem da colônia, com o auxílio de um pincel pelo de camelo número 20, contendo aproximadamente 10 mL de água destilada e esterilizada, para a remoção dos conídios. Em cada placa de Petri, contendo o meio suplementado com as concentrações fungicida, foi depositado 350 µL da suspensão de conídios de cada isolado.

As placas de Petri foram mantidas em câmara incubadora tipo BOD (Biological Oxygen Demand) (Marca Marconi), à temperatura de 22 ± 1 °C e luz contínua, fornecida por três lâmpadas fluorescentes OSRAM Universal, 40 W, situadas 15 cm acima das placas de Petri, por oito horas. Após este período, a germinação foi interrompida com a adição de gotas de solução de acetona (100%) e corante azul de algodão, em cada placa de Petri. Este período foi determinado a partir de testes preliminares que apontaram tempo ideal de oito horas para que os esporos apresentassem germinação ideal para as avaliações de sensibilidade.

2.3 Avaliação

A quantificação da germinação foi realizada por varredura da placa, com o auxílio de microscópio óptico, aumento de 400 x, de 100 conídios por repetição. Considerou-se conídio germinado, aquele que possuía comprimento do tubo germinativo igual ou maior ao menor diâmetro do esporo (ZADOKS & SCHEIN, 1979).

O delineamento experimental foi de tratamentos inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5 (fungicida x isolado) com quatro repetições, cada unidade experimental representada por uma placa de petri. Os experimentos foram realizados duas vezes utilizando-se para a análise estatística a média dos dois ensaios.

Os dados da porcentagem de inibição da germinação de conídios foram submetidos à análise de regressão logarítmica e calculada a concentração que inibe 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) utilizando-se o programa estatístico Costat. A CI_{50} da germinação de esporos foi calculada pela equação gerada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à sensibilidade da germinação de esporos de *D. tritici-repentis*, isolados do trigo, nas diferentes concentrações dos ingredientes ativos azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina são apresentados nas Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7. As porcentagens de inibição

variaram em função de cada fungicida testado, contudo, seguiram uma mesma tendência (Figuras do apêndice 6, 7, 8, 9 e 10).

Os isolados foram classificados, segundo a escala de Edgington et al. (1971) adaptada, para o seguinte critério: insensíveis se a $CI_{50} > 40$ mg/L; baixa sensibilidade se a CI_{50} estiver entre 10 e 40 mg/L; moderadamente sensíveis se a CI_{50} estiver entre 1 e 10 mg/L; altamente sensíveis se a $CI_{50} < 1$ mg/L, sendo CI_{50} definido como a concentração do ingrediente ativo capaz de inibir em 50% da germinação de esporos do isolado.

Valores de CI_{50} para o isolado 01/QTZ oscilaram de 0,75 a > 40 mg/L e o coeficiente de determinação (R^2) variou de 0,63 a 0,94. Na média dos dois experimentos este isolado foi considerado sensível, apresentando valores de CI_{50} menores que 1,0 mg/L, para o fungicida piraclostrobina (0,75 mg/L). O isolado foi considerado insensível para a azoxistrobina, para cresoxim-metílico, para picoxistrobina e para trifloxistrobina, apresentando valores de $CI_{50} > 40$ mg/L, respectivamente (Tabela 3). Nota-se que nenhum dos ingredientes ativos azoxistrobina (Figura 1), cresoxim-metílico (Figura 6), picoxistrobina (Figura 11), piraclostrobina (Figura 16) e trifloxistrobina (Figura 21), inibiu 100% a germinação de esporos do fungo, nas seis concentrações fungicida testadas.

Quanto ao coeficiente de determinação (R^2) para o isolado 02/ONX, os valores situaram-se entre 0,73 a 0,94. Valores da CI_{50} variaram de 0,85 a > 40 mg/L para os cinco fungicidas. O isolado foi considerado insensível apresentando valores maiores que 1mg/L para azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina e trifloxistrobina (> 40 mg/L). Valores menores que 1,0 mg/L foram obtidos para a

piraclostrobina (0,85 mg/L), sendo o isolado considerado sensível para este ingrediente ativo (Tabela 4). Na concentração de 20 mg/L a inibição da germinação de esporos foi de 100% (Figura 17 do Apêndice 9).

As concentrações inibitórias para reduzir em 50% a germinação de esporos para o isolado 03/HTZ variaram de 0,78 a > 40 mg/L, o coeficiente de determinação (R^2) variou de 0,62 a 0,93. O fungo foi considerado sensível para piraclostrobina e insensível aos demais fungicidas (Tabela 5). Nota-se que nenhum tratamento fungicida inibiu 100% a germinação de esporos, exceto a piraclostrobina na concentração 40 mg/L (Figuras 18 do Apêndice 9).

Considerando o Isolado 04/GUA o coeficiente de determinação (R^2) variou de 0,66 a 0,90 e os valores de CI_{50} situaram-se entre 0,58 a > 40 mg/L. O isolado mostrou-se altamente sensível ao ingrediente ativo piraclostrobina (0,58 mg/L). Valores superiores a 1,0 mg/L foram verificados para azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina e trifloxistrobina (> 40 mg/L), sendo o isolado considerado insensível para estes ingredientes ativos (Tabela 6).

Os valores referentes à CI_{50} para o Isolado 05/CD variaram de 1,03 a > 40 mg/L. O coeficiente de determinação (R^2) situou-se entre 0,67 a 0,94 (Tabela 7). Comparando-se estes valores, este isolado classificou-se como insensível aos fungicidas azoxistrobina (> 40 mg/L), cresoxim-metílico (> 40 mg/L), picoxistrobina (> 40 mg/L), piraclostrobina (1,03 mg/L) e trifloxistrobina (> 40 mg/L), ou seja, estes ingredientes ativos se mostraram atóxicos, inócuos para este isolado (REIS et al., 2010) comprovando a redução/perda da sensibilidade a estes fungicidas.

Resultados semelhantes também foram encontrados para os demais isolados para azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina e trifloxistrobina.

Em geral, o fungicida piraclostrobina apresentou potenciais de inibição crescente em função do aumento da concentração do ingrediente ativo de forma mais acentuada quando comparado com os demais IQEs.

Tabela 3. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de *Drechslera tritici-repentis*, Isolado 01/QTZ

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|-------------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Azoxistrobina | $y = -2,21 \text{ Ln}(x) + 93,68$ | 0,70 | > 40 | I |
| Cresoxim-metílico | $y = -1,12 \text{ Ln}(x) + 96,80$ | 0,63 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -0,58 \text{ Ln}(x) + 98,20$ | 0,74 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -13,8 \text{ Ln}(x) + 45,95$ | 0,94 | 0,75 | AS |
| Trifloxistrobina | $y = -1,15 \text{ Ln}(x) + 95,56$ | 0,77 | > 40 | I |

*y = porcentagem de inibição da germinação de esporos, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Média de dois experimentos.

Tabela 4. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de *Drechslera tritici-repentis*, Isolado 02/ONX

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|-------------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Azoxistrobina | $y = -1,73 \text{ Ln}(x) + 94,22$ | 0,84 | > 40 | I |
| Cresoxim-metílico | $y = -0,82 \text{ Ln}(x) + 97,36$ | 0,77 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -1,00 \text{ Ln}(x) + 97,16$ | 0,73 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -14,1 \text{ Ln}(x) + 47,79$ | 0,94 | 0,85 | AS |
| Trifloxistrobina | $y = -0,60 \text{ Ln}(x) + 97,33$ | 0,73 | > 40 | I |

*y = porcentagem de inibição da germinação de esporos, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Média de dois experimentos.

Tabela 5. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de *Drechslera tritici-repentis*, Isolado 03/HZT

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|-------------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Azoxistrobina | $y = -0,42 \text{ Ln}(x) + 98,77$ | 0,62 | > 40 | I |
| Cresoxim-metílico | $y = -0,32 \text{ Ln}(x) + 98,11$ | 0,82 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -0,45 \text{ Ln}(x) + 98,53$ | 0,86 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -13,9 \text{ Ln}(x) + 46,49$ | 0,93 | 0,78 | AS |
| Trifloxistrobina | $y = -0,47 \text{ Ln}(x) + 98,49$ | 0,80 | > 40 | I |

*y = porcentagem de inibição da germinação de esporos, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Média de dois experimentos.

Tabela 6. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de *Drechslera tritici-repentis*, Isolado 04/GUA

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|-------------------|--------------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Azoxistrobina | $y = -2,75 \text{ Ln } (x) + 92,20$ | 0,67 | > 40 | I |
| Cresoxim-metílico | $y = -0,27 \text{ Ln } (x) + 99,09$ | 0,90 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -0,84 \text{ Ln } (x) + 97,50$ | 0,71 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -14,10 \text{ Ln } (x) + 42,31$ | 0,90 | 0,58 | AS |
| Trifloxistrobina | $y = -0,38 \text{ Ln } (x) + 98,75$ | 0,66 | > 40 | I |

*y = porcentagem de inibição da germinação de esporos, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Média de dois experimentos.

Tabela 7. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI_{50}) de *Drechslera tritici-repentis*, Isolado 05/CD

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|-------------------|-------------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Azoxistrobina | $y = -1,56 \text{ Ln } (x) + 95,04$ | 0,79 | > 40 | I |
| Cresoxim-metílico | $y = -0,85 \text{ Ln } (x) + 96,96$ | 0,91 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -1,02 \text{ Ln } (x) + 97,19$ | 0,67 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -13,3 \text{ Ln } (x) + 50,41$ | 0,94 | 1,03 | MS |
| Trifloxistrobina | $y = -0,52 \text{ Ln } (x) + 97,34$ | 0,79 | > 40 | I |

*y = porcentagem de inibição da germinação de esporos, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Média de dois experimentos.

Os fungicidas IQEs interferem na respiração mitocondrial, ao bloquear a transferência de elétrons pelo complexo citocromo bc1, o que interfere na formação de ATP (GHINI & KIMATI, 2000). 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.

A interação entre isolado e fungicida foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 8). Para os cinco fungicidas do grupo das estrobilurinas testadas *in vitro*, na média o ingrediente ativo piraclostrobina apresentou os menores valores de CI_{50} para os cinco isolados estudados, mostrando a maior eficiência na inibição da germinação de esporos de *D. tritici-repentis*. Os valores encontrados variaram entre 0,58 a 1,03 mg/L.

Tabela 8. Concentração inibitória de 50% da germinação de esporos (CI₅₀) de fungicidas para cinco isolados de *Drechslera tritici-repentis* aos fungicidas IQEs

| Fungicida | Isolados (CI ₅₀ mg/L) | | | | | Média |
|-------------------|----------------------------------|----------|----------|----------|----------|--------|
| | 01/QTZ | 02/ONX | 03/HZT | 04/GUA | 05/CD | |
| Azoxistrobina | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | > 40 a |
| Cresoxim-metílico | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | > 40 a |
| Picoxistrobina | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | > 40 a |
| Piraclostrobina | D 0,75 b | B 0,85 b | C 0,78 b | E 0,58 b | A 1,03 b | 0,80 b |
| Trifloxistrobina | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | > 40 a |
| Média | C >32,15 | B >32,17 | C >32,15 | D >32,11 | A >32,20 | |
| CV (%) | 0,02 | | | | | |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Letras minúsculas comparam médias na coluna e as maiúsculas na linha.

Médias de dois experimentos.

A menor CI_{50} foi observada para o isolado 04/GUA quando utilizado o ingrediente ativo piraclostrobina, sendo considerado o mais fungitóxico dentre os demais estrobilurinas comparados, apresentando valor de CI_{50} 0,58 mg/L (Tabela 8).

Os ingredientes ativos azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina e trifloxistrobina, mostraram-se ineficientes na inibição da germinação de esporos do fungo, apresentando valores de $CI_{50} > 40$ mg/L, respectivamente (Tabela 8).

Fungicidas pertencentes ao mesmo grupo químico apresentam resistência cruzada. Isto significa que isolados resistentes a um fungicida também são resistentes aos demais produtos que possuem o mesmo modo de ação (GHINI & KIMATI, 2000). Este fato não foi comprovado neste trabalho, pois houve interação diferencial.

A insensibilidade dos isolados aos fungicidas confirma a resistência para esse grupo de fungicidas, demonstrando que a pressão de seleção exercida pelo contínuo uso dos fungicidas, 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.

4 CONCLUSÕES

A sensibilidade de *D. tritici-repentis* às estrobilurinas foi alterada.

Isolados de *D. tritici-repentis* em estudo demonstraram insensibilidade aos fungicidas azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina e trifloxistrobina em relação à germinação dos conídios.

Piraclostrobina mostrou maior eficiência na inibição da germinação de esporos quando comparado com as demais fungicidas avaliados.

CAPÍTULO V

SENSIBILIDADE MICELIANA DE *Drechslera siccans* A FUNGICIDAS, *IN VITRO*

ROSANE B. TONIN¹ & ERLEI MELO REIS²

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi determinar, *in vitro*, a sensibilidade miceliana de *Drechslera siccans*, isolados do trigo aos fungicidas triazóis (IDMs) (ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol, protoconazol e tebuconazol) e estrobilurinas (IQEs) (azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina). Sete concentrações dos fungicidas foram empregadas 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 20,00 e 40,00 mg/L de i.a e, cinco isolados do fungo. A concentração 0,00 mg/L representou a testemunha, sem adição de fungicida. A avaliação do crescimento miceliano foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital, medindo-se o diâmetro das colônias, quando o crescimento do fungo no tratamento testemunha atingiu a borda da placa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os resultados da porcentagem de inibição do crescimento miceliano foram submetidos à análise de regressão logarítmica e calculada a concentração inibitória (CI₅₀). Os dados mostraram variação quanto à fungitoxicidade dos ingredientes ativos,

¹Eng. Agr., M. Sc., doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia. rosanetonin@yahoo.com.br

²Orientador, Eng. Agr., Ph.D., professor da FAMV/PPGAgro/UPF - erleireis@tpo.com.br

desde altamente fungitóxicos a atóxicos para os isolados de *D. siccans*. Os fungicidas IDMs apresentaram as menores CI_{50} comparados com os IQEs. Valores da CI_{50} situaram-se entre $< 0,1$ a $0,66$ mg/L para os IDMs e entre $0,84$ a > 40 mg/L para os IQEs. A insensibilidade do fungo foi observada para azoxistrobina e picoxistrobina para os cinco isolados e, trifloxistrobina para os isolados 01/F30, 02/RZ e 03/SF.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, mancha foliar, fungitoxidade, CI_{50} .

***IN VITRO* MYCELIAL SENSITIVITY OF *Drechslera siccans*,
ISOLATED FROM WHEAT TO FUNGICIDES, *IN*
*VITRO***

ABSTRACT – The objective was to determine *in vitro* the mycelial sensitivity of *Drechslera siccans*, isolated from wheat to fungicides (IDM) (cyproconazole, epoxiconazole, propiconazole, tebuconazole and prothioconazole) and strobilurins (IQE) (azoxystrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin and trifloxystrobin). Seven concentrations of the fungicides 0.00, 0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 20.00 and 40.00 mg/L water of a.i. for five fungal isolates were used. The concentration of 0.00 mg/L represented the control without fungicide. The mycelial growth evaluation was performed with a caliper measuring the colony diameter when the fungal growth, in the control treatment has reached the plate edge. The experimental design was a completely randomized with four replications. The percentage

inhibition data of mycelium growth were analyzed by logarithmic regression and IC_{50} calculated. The data showed variation in the fungitoxicity of the active ingredients from nontoxic to highly fungitoxic to the strains of *D. siccas*. Fungicides IDMs had the lowest IC_{50} compared with IQEs. IC_{50} values ranged from < 0.1 to > 40 mg/L. The insensitivity of the fungus was observed for azoxystrobin and picoxystrobin for the five isolates and for trifloxystrobin, isolates 01/F30 and 02/RZ 03/SF.

Keywords: *Triticum aestivum*, leaf spot, fungitoxicity, IC_{50} .

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) ocupa papel de destaque dentre os cereais produzidos no Brasil, tendo importante função econômica e social. No sul do Brasil, é a principal cultura da estação de inverno em área ocupada, volume de produção e importância econômica (WELTER, informação verbal).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2012), a produção nacional de trigo na safra 2011/12, foi de 5.788 milhões de toneladas e o consumo de 11 milhões de toneladas.

Entre os fatores que afetam a produção de trigo, estão às doenças, causadas principalmente por fungos, entre eles os causadores de manchas foliares, alvo de preocupação dos produtores e também dos pesquisadores, devido aos danos que podem causar à cultura se não forem devidamente controlados.

A mancha-amarela do trigo, cujo agente causal é o fungo *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker, é uma doença foliar de expressão econômica em diversas áreas produtoras de trigo conduzidas em monocultura e sistema de plantio direto, no Brasil. A doença é cosmopolita, encontrando-se em mais de 21 países (METHA, 1993). O dano causado ao trigo pelas manchas foliares pode ser estimado pela função normalizada $R = 1.000 - 5,7 I$ (R= rendimento de grãos e I = incidência foliar) (REUNIÃO, 2011).

Fato novo verificado na safra tritícola de 2008 em amostras foliares de trigo analisadas na Universidade de Passo Fundo, foi a constatação da presença de uma nova espécie, *Drechslera*

siccans (Drechsler) Shoemaker, como agente causal da mancha-amarela da folha do trigo (TONIN & REIS, 2009).

O fungo *D. siccans* ataca preferencialmente o azevém (*Lolium multiflorum* L. e *L. perene* (SCHUBIGER & BOLLER, 2009). Na literatura, também outros tipos de gramíneas são relatadas como hospedeiras, dentre elas a aveia (*Avena sativa*), o capim-lanudo (*Holcus lanatus*), a cevada (*Hordeum vulgare*), a grama-azul (*Poa pratensis*), o bromo-cevada (*Bromus molli*), o capim-cevadinha (*B. inermis*), a cevadilha (*B. unioloides*), o pé-de-galo (*Dactylis glomerata*), a erva-carneira (*Festuca pratensis*), a festuca-alta (*F. arundinacea*), a festuca-vermelha-das-dunas (*F. rubra*), a erva-de-conta (*Arrhenatherum elatius*), o rabo-de-gato (*Phleum pratense*), a aveia-amarela (*Trisetum flavescens*) e o trigo (*Triticum aestivum*) (SHOEMAKER, 1962; AMMON, 1963; LATCH, 1966; MÄKELÄ, 1971; ELLIS, 1971).

O patógeno está amplamente disseminado em regiões de clima temperado da Europa, Austrália e América do Norte e infecta principalmente as espécies dos gêneros *Lolium* e *Festuca* (SCHUBIGER, 2009). Segundo Araújo (1976) o azevém é uma das melhores gramíneas de inverno e atualmente está perenizado em quintais, terrenos baldios, ao longo de estradas, rodovias e campos, onde faz parte da vegetação.

O manejo da mancha amarela é feito pela adoção de práticas integradas como: cultivar resistente ou tolerante, semente sadia, tratamento de semente com fungicida, semeadura na época indicada, rotação de culturas e aplicação de fungicidas (REIS & CASA, 2007).

O uso de fungicidas é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, porém seu uso constante pode promover a seleção de linhagens resistentes colocando em risco a eficiência do método (GHINI & KIMATI, 2000).

Devido a reclamações da deficiência no controle químico da mancha-amarela, conduziu-se estudo *in vitro* para determinar a sensibilidade miceliana de *D. siccans*, isolados do trigo, aos fungicidas inibidores da desmetilação (IDM) e da quinona externa (IQE).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS.

Para avaliar a sensibilidade miceliana de *D. siccans* a fungicidas, o bioensaio empregado foi o de incorporação de fungicidas ao meio de cultura fundente, semelhante ao método descrito por (RUSSEL, 2004).

2.1 Isolados de *D. siccans*

Os isolados de *D. siccans* utilizados nos ensaios foram obtidos por isolamento a partir de folhas com sintomas da doença, coletadas em lavouras de trigo.

Culturas puras dos isolados selecionados foram preservadas em tubo de ensaio com meio BDA, em refrigerador à

temperatura de 5 °C. Os experimentos para a avaliação do crescimento miceliano foram realizados com cinco isolados (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos isolados de *Drechslera siccans*

| Isolado | Cultivar | Local | Designação |
|---------|-------------|----------------|------------|
| 01 | Fundacep 30 | Lagoa Vermelha | 01/F30 |
| 02 | Raízes | Panambi | 02/RZ |
| 03 | Safira | Coxilha | 03/SF |
| 04 | Fundacep 52 | Vacaria | 04/F52 |
| 05 | Vaqueano | Passo Fundo | 05/VQ |

2.2 Fungicidas

Para a avaliação do crescimento miceliano quanto à sensibilidade de isolados de *D. siccans*, utilizou-se cinco fungicidas pertencentes ao grupo químico dos triazóis ou inibidores da desmetilação (IDMs) ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol, protioconazol e tebuconazol e, quatro fungicidas do grupo químico das estrobilurinas, ou inibidores da quinona externa na mitocôndria (IQEs) azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina.

Estes fungicidas são recomendados isolados ou em mistura de IDMs mais IQEs, para o controle da mancha-amarela na cultura do trigo, exceto picoxistrobina (REUNIÃO, 2011). Um fungicida novo, protioconazol, foi incluído nos testes.

Tabela 2. Fungicidas utilizados para determinar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Drechslera siccas*

| Produto técnico | Formulação comercial | Ingrediente ativo (g/L) | Grupo químico |
|------------------|----------------------|-------------------------|-----------------|
| Ciproconazol | Alto 100 SC | 100 g/L | Triazol |
| Epoxiconazol | Opus SC | 125 g/L | Triazol |
| Propiconazol | Tilt EC | 250 g/L | Triazol |
| Protioconazol | Proline EC | 250 g/L | Triazolinthione |
| Tebuconazol | Folicur 200 EC | 200 g/L | Triazol |
| Azoxistrobina | Priori SC | 250 g/L | Estrobilurina |
| Picoxistrobina | Acapela SC | 250 g/L | Estrobilurina |
| Piraclostrobina | Comet EC | 250 g/L | Estrobilurina |
| Trifloxistrobina | Twist CE | 125 g/L | Estrobilurina |

Fonte: AGROFIT

2.3 Determinação *in vitro* da sensibilidade miceliana a fungicidas

Nos ensaios foram testadas sete concentrações dos fungicidas: 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 20,00 e 40,00 mg/L de ingrediente ativo de cada fungicida. A concentração 0,00 mg/L, ou ausência de fungicida, representou a testemunha de cada experimento.

Para o preparo das suspensões alíquotas de fungicidas foram transferidos com o auxílio de um micropipetador para balão volumétrico contendo água destilada e esterilizada (ADE), resultando em um volume final de 100 mL. Desta primeira suspensão fungicida transferiu-se 1 mL para 99,0 mL de ADE para outro balão volumétrico, constituindo a segunda diluição. Após o preparo das suspensões acrescentou-se os volumes necessários ao meio de cultura BDA desidratado/39 g/L (Batata-Dextrose-Ágar), para que as concentrações desejadas fossem satisfeitas. Os frascos foram

cuidadosamente agitados e o meio vertido em placas de petri (tamanho 90 x 15 mm) previamente esterelizadas em câmara de fluxo laminar.

Discos do micélio de cada isolado, com 5 mm de diâmetro, retirados da borda de colônias com sete dias de crescimento, foram colocados no centro de cada placa de Petri contendo o substrato suplementado com as concentrações do fungicida testado. As placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, proporcionado por três lâmpadas fluorescentes, 40 W, posicionados a 50 cm acima das placas.

Devido à limitação encontrada na obtenção de esporos do fungo, os fungicidas triazóis e estrobilurinas, foram testados quanto ao crescimento miceliano.

2.4 Avaliação

A avaliação foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital (marca Mitutoyo) medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, quando o crescimento do fungo, no tratamento testemunha, atingiu à borda da placa.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (fungicida x isolado) com quatro repetições, cada unidade experimental representada por uma placa de petri. Os experimentos foram realizados duas vezes utilizando-se para a análise estatística a média dos dois ensaios.

Os dados da porcentagem de inibição do crescimento miceliano foram submetidos à análise de regressão logarítmica e calculada a concentração que inibe 50% do crescimento miceliano

(CI_{50}) utilizando-se o programa estatístico Costat. A CI_{50} do crescimento miceliano foi calculada pela equação gerada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme os resultados obtidos nas Figuras (1 a 45) nota-se que nenhum tratamento fungicida inibiu 100% o crescimento miceliano do fungo nas concentrações de 0,01, 0,10 e 1,0 mg/L. Observou-se para os fungicidas IDM crescimento micelial decrescente, em função do aumento da concentração do fungicida ao qual o fungo foi exposto, estando o limite entre 1,0 e 10 mg/L para a maioria dos isolados, exceto para o fungicida tebuconazol, isolados 01/F30, 02/RZ, 03/SF e 04/F52. Este fato não foi observado para os fungicidas do IQEs, tendo o crescimento ocorrido até a concentração de 40 mg/L para todos isolados.

Os resultados da determinação da concentração inibitória (CI_{50}) dos fungicidas testados para os cinco isolados avaliados, consta nas Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7.

Os isolados foram classificados, segundo a escala de Edgington et al., (1971) adaptada, seguindo o seguinte critério: insensíveis se a $CI_{50} > 40$ mg/L; baixa sensibilidade se a CI_{50} estiver entre 10 e 40 mg/L; moderadamente sensíveis se a CI_{50} estiver entre 1 e 10 mg/L; altamente sensíveis se a $CI_{50} < 1$ mg/L, sendo CI_{50} definida como a concentração do ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento miceliano ou da germinação de esporos do isolado.

O isolado 01/F30 foi considerado sensível de acordo com a classificação de Edgington et al. (1971), apresentando valores de CI_{50} menores que 1,0 mg/L, para os fungicidas do grupo químico IDMs ciproconazol, epoxiconazol, propiconazol, protioconazol e tebuconazol (Tabela 3). Para os fungicidas IQEs, azoxistrobina, picoxistrobina e trifloxistrobina o isolado foi considerado insensível apresentando valores de $CI_{50} > 40$ mg/L. O isolado foi considerado moderadamente sensível para o ingrediente ativo piraclostrobina. O coeficiente de determinação (R^2) variou de 89,9 a 99,3.

Considerando o isolado o Isolado 02/RZ, valores de CI_{50} variaram de $< 0,1$ a 0,51 mg/L para os triazóis e, o coeficiente de determinação (R^2) situou-se entre 0,87 a 99,2. Valores superiores a 1,0 mg/L foram verificados para azoxistrobina (> 40 mg/L), picoxistrobina (> 40 mg/L), e trifloxistrobina (> 40 mg/L), sendo o isolado considerado insensível para estes ingrediente ativo e classificado como moderadamente sensível de acordo com Edgington et al. (1971) para piraclostrobina com valor de CI_{50} 1,94 mg/L (Tabela 4).

Resultados similares foram encontrados para os isolados, 03/SF, 04/F52 e 05/VQ (Tabelas 5, 6 e 7), seguindo classificação de Edgington et al. (1971), foram considerados altamente sensíveis para os fungicidas do grupo químico IDMs. Os valores da CI_{50} situaram-se entre 0,14 a 0,65 mg/L.

Em geral, os fungicidas IDMs apresentaram potenciais de inibição crescente em função do aumento da concentração do ingrediente ativo.

A insensibilidade do fungo foi observada para azoxistrobina e picoxistrobina para os cinco isolados e, trifloxistrobina para os isolados 01/F30, 02/RZ e 03/SF. Para piraclostrobina os isolados mostraram-se moderadamente sensíveis, exceto o 04/F52 que foi sensível a este fungicida. Valores de CI_{50} para os IQEs situaram-se entre 0,84 a > 40 mg/L, respectivamente.

Tabela 3. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de *Drechslera siccans*, Isolado 01/F30

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|------------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| Ciproconazol | $y = -11,2 \text{ Ln}(x) + 38,65$ | 0,95 | 0,36 | AS |
| Epoxiconazol | $y = -10,5 \text{ Ln}(x) + 36,56$ | 0,96 | 0,28 | AS |
| Propiconazol | $y = -10,7 \text{ Ln}(x) + 37,88$ | 0,96 | 0,32 | AS |
| Protioconazol | $y = -10,6 \text{ Ln}(x) + 34,16$ | 0,90 | 0,22 | AS |
| Tebuconazol | $y = -10,3 \text{ Ln}(x) + 45,74$ | 0,97 | 0,66 | AS |
| Azoxistrobina | $y = -3,42 \text{ Ln}(x) + 82,71$ | 0,96 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -4,28 \text{ Ln}(x) + 76,64$ | 0,98 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -9,23 \text{ Ln}(x) + 51,43$ | 0,98 | 1,17 | MS |
| Trifloxistrobina | $y = -5,04 \text{ Ln}(x) + 75,28$ | 0,99 | > 40 | I |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera siccans* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Tabela 4. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de *Drechslera siccans*, Isolado 02/RZ

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|------------------|----------------------------|-------|----------------|-------|
| Ciproconazol | $y = -11,6 \ln(x) + 41,32$ | 0,97 | 0,47 | AS |
| Epoxiconazol | $y = -10,2 \ln(x) + 36,98$ | 0,98 | 0,28 | AS |
| Propiconazol | $y = -11,8 \ln(x) + 42,15$ | 0,98 | 0,51 | AS |
| Protioconazol | $y = -8,74 \ln(x) + 28,61$ | 0,87 | < 0,1 | AS |
| Tebuconazol | $y = -9,93 \ln(x) + 42,98$ | 0,95 | 0,49 | AS |
| Azoxistrobina | $y = -3,26 \ln(x) + 85,66$ | 0,99 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -3,70 \ln(x) + 79,26$ | 0,98 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -8,82 \ln(x) + 55,85$ | 0,98 | 1,94 | MS |
| Trifloxistrobina | $y = -5,24 \ln(x) + 74,46$ | 0,98 | > 40 | I |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera siccans* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Tabela 5. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de *Drechslera siccans*, Isolado 03/SF

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|------------------|----------------------------|-------|----------------|-------|
| Ciproconazol | $y = -11,0 \ln(x) + 37,38$ | 0,93 | 0,32 | AS |
| Epoxiconazol | $y = -11,7 \ln(x) + 39,35$ | 0,94 | 0,40 | AS |
| Propiconazol | $y = -10,5 \ln(x) + 37,19$ | 0,95 | 0,30 | AS |
| Protioconazol | $y = -11,0 \ln(x) + 35,17$ | 0,90 | 0,26 | AS |
| Tebuconazol | $y = -11,4 \ln(x) + 45,05$ | 0,95 | 0,65 | AS |
| Azoxistrobina | $y = -3,49 \ln(x) + 81,14$ | 0,99 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -3,70 \ln(x) + 79,57$ | 0,97 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -8,64 \ln(x) + 53,53$ | 0,99 | 1,50 | MS |
| Trifloxistrobina | $y = -4,74 \ln(x) + 77,14$ | 0,98 | > 40 | I |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera siccans* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Tabela 6. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de *Drechslera siccans*, Isolado 04/F52

| Fungicida | Equação de regressão * | R^2 | CI_{50} ** | S^1 |
|------------------|----------------------------|-------|--------------|-------|
| Ciproconazol | $y = -11,5 \ln(x) + 40,47$ | 0,98 | 0,44 | AS |
| Epoxiconazol | $y = -10,9 \ln(x) + 37,67$ | 0,96 | 0,32 | AS |
| Propiconazol | $y = -10,5 \ln(x) + 37,26$ | 0,96 | 0,30 | AS |
| Protioconazol | $y = -10,9 \ln(x) + 34,87$ | 0,89 | 0,25 | AS |
| Tebuconazol | $y = -11,4 \ln(x) + 44,34$ | 0,96 | 0,61 | AS |
| Azoxistrobina | $y = -4,43 \ln(x) + 79,99$ | 0,95 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -5,08 \ln(x) + 75,60$ | 0,98 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -10,2 \ln(x) + 48,17$ | 0,98 | 0,84 | AS |
| Trifloxistrobina | $y = -7,50 \ln(x) + 62,52$ | 0,98 | 5,31 | MS |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera siccans* ao fungicida: AS (alta sensibilidade),

MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Tabela 7. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de *Drechslera siccans*, Isolado 05/VQ

| Fungicida | Equação de regressão * | R^2 | CI_{50} ** | S^1 |
|------------------|----------------------------|-------|--------------|-------|
| Ciproconazol | $y = -11,0 \ln(x) + 36,38$ | 0,92 | 0,29 | AS |
| Epoxiconazol | $y = -11,8 \ln(x) + 39,27$ | 0,93 | 0,40 | AS |
| Propiconazol | $y = -10,5 \ln(x) + 37,21$ | 0,94 | 0,30 | AS |
| Protioconazol | $y = -9,73 \ln(x) + 31,07$ | 0,87 | 0,14 | AS |
| Tebuconazol | $y = -12,0 \ln(x) + 40,21$ | 0,94 | 0,44 | AS |
| Azoxistrobina | $y = -4,46 \ln(x) + 76,04$ | 0,98 | > 40 | I |
| Picoxistrobina | $y = -3,79 \ln(x) + 77,54$ | 0,98 | > 40 | I |
| Piraclostrobina | $y = -9,01 \ln(x) + 52,05$ | 0,98 | 1,26 | MS |
| Trifloxistrobina | $y = -6,18 \ln(x) + 70,66$ | 0,97 | 28,31 | BS |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera siccans* ao fungicida: AS (alta sensibilidade),

MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

Para os cinco fungicidas triazóis testados *in vitro* e para os cinco isolados, o ingrediente ativo protioconazol apresentou a menor CI_{50} , mostrando a maior eficiência na inibição do crescimento miceliano de *D.siccans* (Tabela 8). Os valores encontrados variaram entre $< 0,1$ a $0,26$ mg/L. Na concentração de 10 mg/L a inibição do crescimento miceliano foi de 100% (Figuras do Apêndice 14).

Nota-se que na média, os maiores valores de CI_{50} foram observados para o fungicida tebuconazol, com valores de CI_{50} entre $0,44$ a $0,66$ mg/L, mostrando que os isolados são menos sensíveis *in vitro* a esse fungicida.

A menor CI_{50} foi observada para o isolado 02/RZ, para o ingrediente ativo protioconazol. Na média, os ingredientes ativos ciproconazol, epoxiconazol e propiconazol apresentaram fungitoxicidade equivalente.

Stolte, (2006), em trabalho conduzido com *D. tritici-repentis*, encontrou valores de $CI_{50} < 0,1$ mg/L para os fungicidas propiconazol, epoxiconazol e ciproconazol e maiores valores de CI_{50} ($0,54$) para tebuconazol, o mesmo observado nesse estudo. Alta sensibilidade ao ingrediente ativo propiconazol também foi observada por Sartori, (2008), trabalhando com isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., com valores de $ED_{50} < 1$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 8. Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de fungicidas para cinco isolados de *Drechslera siccans* aos fungicidas IDMs

| Fungicida | Isolados (CI_{50} mg/L) | | | | | Média |
|---------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|
| | 01/F30 | 02/RZ | 03/SF | 04/F52 | 05/VQ | |
| Ciproconazol | 0,36 ^{ns} | 0,47 ^{ns} | 0,32 ^{ns} | 0,44 ^{ns} | 0,29 ^{ns} | 0,37 b |
| Epoxiconazol | 0,28 | 0,28 | 0,40 | 0,32 | 0,40 | 0,33 b |
| Propiconazol | 0,32 | 0,51 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,34 b |
| Protioconazol | 0,22 | < 0,1 | 0,26 | 0,25 | 0,14 | 0,21 c |
| Tebuconazol | 0,66 | 0,49 | 0,65 | 0,61 | 0,44 | 0,57 a |
| Média | 0,36 | 0,37 | 0,38 | 0,38 | 0,31 | |
| CV (%) | 9,05 | | | | | |

^{ns} Não significativo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam médias na coluna e as maiúsculas na linha. Médias de dois experimentos.

A pressão de seleção exercida pela aplicação de fungicidas é o principal fator responsável pela redução de sensibilidade das populações de fungos (GHINI & KIMATI, 2000). 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.

Os fungicidas azoxistrobina e picoxistrobina mostraram-se atóxicos para os isolados testados, o mesmo observando-se para os isolados 01/F30, 02/RZ, 03/SF para trifloxistrobina, sendo estes considerados menos fungitóxicos com valores de CI_{50} superiores a 40 mg/L (Tabela 9). A menor CI_{50} foi observada para o isolado 04/F52 para piraclostrobina. O fungicida azoxistrobina foi considerado ineficiente ($ED_{50} > 50$ mg/L), quanto à inibição do crescimento micelial de *Amphobotrys ricini* (Buchwald) Hennebert (CHAGAS,

2009). Kimura et al. (2001) avaliando a sensibilidade *in vitro* de *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. provenientes de viveiros de eucalipto, a vários fungicidas, também observaram baixa sensibilidade ao fungicida azoxistrobina tanto para crescimento micelial quanto para germinação de conídios.

Tabela 9. Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI₅₀) de fungicidas para cinco isolados de *Drechslera siccas* aos fungicidas IQEs

| Fungicida | Isolados (CI ₅₀ mg/L) | | | | | Média |
|------------------|----------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|---------|
| | 01/F30 | 02/RZ | 03/SF | 04/F52 | 05/VQ | |
| Azoxistrobina | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | > 40 |
| Picoxistrobina | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | > 40 |
| Piraclostrobina | BC 1,17 b | A 1,94 b | AB 1,50 b | C 0,84 c | BC 1,26 c | 1,34 |
| Trifloxistrobina | A > 40 a | A > 40 a | A > 40 a | C 5,31 b | B 28,31b | > 30,72 |
| Média | 30,29 A | 30,48 A | 30,37 A | 21,53 C | 27,39 B | |
| CV (%) | 7,31 | | | | | |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Letras minúsculas comparam médias na coluna e as maiúsculas na linha.

Médias de dois experimentos.

Observou-se crescimento miceliano para todos isolados avaliados até a concentração de 40 mg/L para as quatro estrobilurinas (Figura dos Apêndices 16 a 19).

O ingrediente ativo piraclostrobina, mostrou-se o mais potente quando comparado com as demais estrobilurinas testadas, apresentando valores de CI_{50} entre 0,84 a 1,94 mg/L. Em estudo conduzido com *C. lindemuthianum* os isolados foram classificados de acordo com os valores de DL_{50} como altamente sensíveis a este fungicida (GULART, 2009; SARTORATO, 2006).

Conforme resultados obtidos no presente trabalho, constatou-se redução de sensibilidade de *D.siccans*, para os fungicidas do grupo químico das estrobilurinas e alta fungitoxicidade para os fungicidas triazóis.

4 CONCLUSÕES

Comparando os grupos químicos dos IDMs e IQEs, os triazóis apresentaram alta fungitoxicidade.

O fungicida protioconazol mostrou-se o mais eficiente entre os triazóis.

O fungicida piraclostrobina mostrou-se o mais potente, quando comparado com as demais estrobilurinas.

O ingrediente ativo tebuconazol, apresentou os maiores valores de CI_{50} entre os triazóis testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT (Base de dados de produtos agrotóxicos e fitossanitários). Secretaria de Defesa Agropecuária/ Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasília. 2012.

ALMEIDA, A. M. R. & YAMASHITA J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, vol. nº1, p. 203 -206. 1976.

AMMON, H.U. Über einige Arten aus den Gattungen *Pyrenophora* Fries und *Cochliobolus* Drechsler mit *Helminthosporium* als Nebenfruchtform. *Phytopathologische Zeitschrift* 47: 244- 300, 1963.

ANESIADIS, T.; KAROAGLANIDIS, G. S.; TZAVELLA-KLONARI, K. Protective, curative and eradicator activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. *Journal of Phytopathology* 151: 647- 651, 2003.

ARAÚJO, A.A. Melhoria das pastagens - agrostologia rio-grandense, Porto Alegre, Livraria Editora Sulina, 4ª edição, 208p. 1976.

ARDUIM, G.S.; REIS, E.M.; BARCELLOS, A.L. Sensibilidade de *Puccinia triticina* quando tratadas curativamente com diferentes fungicidas *in vivo*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 32 (suplemento). Resumo n.º 424, 2007.

ARDUIM, G.S. Sensibilidade de raças de *Puccinia triticina* a fungicidas. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo/UPF. Passo Fundo/RS, 2009.

ARRUDA, M.A., BUENO, C.R.N.C., ZAMPROGNO, K.C., LAVORENTI, N.A. & URASHIMA, A.S. Reação do trigo à *Magnaporthe grisea* nos diferentes estágios de desenvolvimento. *Fitopatologia Brasileira* 30:121-126. 2005.

AZEVEDO, L. A. S. Fungicidas sistêmicos: teoria e prática. Fundamentos para o uso racional. Campinas: Emopi Gráfica Editora Ltda, 2007. 290 p.

BALARDIN, R.S. Eficiência de metconazole, Stratego, PE 11200, Artea, Foliur 200 CE, Propiconazole + Tebuconazole 250 CE, Horizon, JAU 6476 250 CE no controle de mancha na folha na cultivar BR 16 de trigo (*Triticum aestivum*). XXXIII Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa do Trigo. Atas e Resumos. Passo Fundo, RS, Brasil. p. 118, 2001.

BEARD, C.; LOUGHMAN, R.; SMITH, A.; SPEIJERS, J. Baseline sensitivity to three triazole fungicides in *Pyrenophora tritici-repentis*. Australasian Plant Pathology, p. 168-172, 2009.

BLIXT, E.; DJURLE, A.; YUEN, J.; OLSON, A. Fungicide sensitivity in Swedish isolates of *Phaeosphaeria nodorum*. Plant Pathology, p. 655–664, 2009.

BOHATCHUK, D.A.; CASA, R.T.; BOGO, A.; KUHNEM, P.J.; REIS, E. M.; MOREIRA, E.N. Modelo de ponto crítico para estimar danos de doenças foliares do trigo em patossistema múltiplo. Tropical Plant Pathology, vol. 33, 5, 363-369, 2008.

BRAVERMAN, S.W. and GRAHAM, J.H. *Helminthosporium dictyoides* and related species on forage grasses. Phytopathology. 50:691-695, 1960.

BRENT, K.J. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? Brussels: FRAC Monograph 1, 1995.

BRENT, K. J.; HOLLOWAY, D.W. Fungicide resistance: The assessment of risk FRAC Monograph No 2, Global Crop Protection Federation, Brussels, 1998. 48p.

BRUNELLI, K.R.; FAZZA, A.C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L.E.A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zea-maydis*. Summa Phytopatologica, v. 32, p. 92-94, 2006.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; BEZERRA, R.; Herok, P.; Silva, A. Efeito de manchas foliares no rendimento de grãos de trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.445, 2001.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; BLUM, M.M.C. Critério: Limiar de Dano Econômico (LDE) e quantificação de danos. In: Critérios indicadores do momento para aplicação de fungicidas visando ao controle de doenças em soja e trigo. Ed. Aldeia Norte. Passo Fundo, 148 p., 2009.

CHAGAS, H.A. Controle de mofo-cinzento (*Amphobotrys ricini*) da mamoneira (*Ricinus communis* L.) por métodos químico, biológico e com óleos essenciais. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 67p. 2009.

COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York. John Wiley & Sons Inc. 1958.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento de safra brasileira: Último levantamento, janeiro 2012.

COSTA NETO, J.P. Fungos observados em gramíneas e leguminosas no Rio Grande do sul. *Revista da Faculdade de Agronomia e veterinária*. Porto Alegre, UFRGS. p.51-67, 1967.

CSBPT - Comissão Sul - Brasileira de Pesquisa de Trigo. 2006. Indicações técnicas para a cultura do trigo. Passo Fundo, RS: Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale. EMBRAPA, Passo Fundo, RS, Brasil. 114 p.

DANELLI, A.L.D.; REIS, E.M.R.; FIALLOS, F.R.G. Etiologia e intensidade de manchas foliares em cultivares de trigo em três locais do Rio Grande do Sul, Brasil. *Scientia Agropecuaria*. p.149 - 155, 2011.

DEKKER, H. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: LYR, H. (Ed.). *Modern selective*

fungicides: properties, applications, mechanisms of action. 2. ed. New York: Gustav Fisher, p. 23-38, 1995.

DHINGRA, O.; SINCLAIR, J. B. Basic plant pathology methods. Boca Raton: CRC Press Inc., 1985. 434 p.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARROW, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*: vol. 61, p. 42-44, 1971.

EDGINGTON, L. V.; Martin, R. A.; Bruin, G. C.; ParsonS, I. M. Systemic Fungicides: A Perspective After 10 Years. *Plant Disease*: vol. 64, n. 1, p. 19-23, 1980.

ELLIOTT, E.S. The effect of the sugar concentration on conidial size of some species de *Helminthosporium*. *Phytopathology* 39:953-958. 1949.

ELLIS, M.B. Dematiaceus Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey England: 608 p., 1971.

EUROPEAN AND MEDITERRANEUM PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Fungicide resistance: definitions and use of terms. OEPP/EPPO Bulletin, v. 18, n. 4, p. 569-571. 1988.

FERNANDES, M.C.A. & SANTOS, S.A. Cultivo de *Ampelomyces quisqualis* e interferência de fungicidas no seu crescimento *in vitro*. *Fitopatologia Brasileira* 21:26-29. 1996.

FERNANDEZ, M. R. Manual para laboratório de fitopatologia. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 6), 128 p., 1993.

FORCELINI, C.A.; GOELLNER, C.I.; MIO, L.L.M. Resistência de fungos a fungicidas. In: Revisão Anual de Patologia de Plantas, Associação 9, p. 339-381. 2001.

GEORGOPOULOS, S. G. Genetical and Biochemical Background of Fungicide Resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G. Fungicide Resistance in Crop Protection. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982, p. 46-52.

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

GRIFFIN, D.H. Fungal physiology. 2ed. New York: Willey-Liss, 1994.

GULART, C.A. Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (SACC & MAGN.) BRIOSI & CAV., a fungicidas sistêmicos. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil 2009.

HARDING, H. Effect of pH and sucrose concentration on conidium size and septation in four *Bipolaris* species. Canadian Journal of Botany 53:1457-1464. 1975a.

HARDING, H. Effect of d-amino acids on conidium size and numbers of pseudosepta per conidium in isolates of *Bipolaris sorokiniana*. Canadian Journal of Botany 53:600-603. 1975b.

HOSFORD, R.M. Jr. A form of *Pyrenophora trichostoma* pathogenic to wheat and other grasses. Phytopathology, pág. 28-32, 1971.

HOSFORD Jr., R.M. Tan spot. In: HOSFORD Jr., R.M. (Ed.). Tan spot of wheat and related diseases workshop. Fargo, North Dakota State University. p.1-24, 1982.

HUNGER, R. M.; BROWN, D. A. Colony color, sporulation, Fungicide sensitivity and pathogenicity of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease*, v. 71, n. 10, p. 907-910, 1987.

KAFI, A. & TARR, S.A.J. Growth, sporulation and conidial characteristics of five graminicolous species of *Helminthosporium*: I.

Effect of nutrients. Transactions British Mycological Society 49: 327-337. 1966.

KIMATI, H. Controle químico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). Manual de fitopatologia. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.46-95.

KIMURA, M.K.; SOUZA, P.E. & CASTRO, H.A. Sensibilidade *in vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 25, n.5, p. 1150-1160, 2001.

KRAN, T. N. Effect of light on sporulation in *Drechslera tritici-repentis*. Trans. Br. Mycol. Soc. 56 (2), 1971.

KRUPINSKY, J.M. Grass hosts of *Pyrenophora tritici-repentis*. Plant Disease, St. Paul, v.76, n.1, p.92-95, 1992.

KRUPINSKY, J.M. Growth and sporulation of *Botryodiplodia hypodermia* in response to different agar media and temperatures. Plant Disease 66:481-483. 1982.

LAMARI, L. & BERNIER, C.C. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) based on lesion type. Can. J. Plant Pathol. 11:49-56, 1989.

LANZARINI, A.C. Alterações metabólicas, eficiência da transmissão e danos promovidos pelo Barley yellow dwarf virus (BYDV-PAV) em cinco cultivares de trigo. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo/UPF. Passo Fundo/RS, p. 96, 2006.

LATCH, G.C.M. Fungus diseases of ryegrasses in New Zealand: I. Foliage diseases. New Zealand Journal of Agricultural Research, Vol. 9 No. 2: 394-409, 1966.

LEACH, C. M. Sporulation of diverse species of fungi under near ultraviolet radiation. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.40, n.1, p. 151-161, 1962.

LUKENS, R.J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. American Journal of Botany, New York, v.50, n.7, p.721-724, 1963.

LUO, Y. & ZENG, S.M. Simulation studies on epidemics of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis*) on slow-rusting cultivars and analysis of effects of resistance components. Plant Pathology 44:340-349. 1995.

LUTTRELL, E.S. A taxonomic revision of *Helminthosporium sativum* and related species. American Journal of Botany 42:47-68. 1955.

LUZ, W.C. & LUZZARDI, G.C. Ocorrência de *Helminthosporium tritici-repentis* Died, em sementes de trigo. VIII Reunião Anual de Pesquisa de Trigo, Ponta Grossa PR, 1976.

MÄKELÄ, K. Some graminicolous species of *Helminthosporium* in Finland. Karstenia. p. 5-35, 1971.

MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Seed health testing of rice IV. Effect of light and temperature on seed-borne fungi in the blotter test. Handbook on Seed Health Testing, Vollebakk, v.37, n.3, p.723-730, Mar. 1973.

McGRATH, M.T. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experiences and challenges. *Plant Disease*: v. 85, p. 236-245, 2001.

MEHTA, Y.R.; GAUDÊNCIO, C.A. The effects of tillage practices and crop rotation on the epidemiology of some major wheat diseases. In: SANDERS, D.F. (Ed.). Wheat for the nontraditional, warm areas. México, D.F., CIMMYT. p.266-283, 1991.

METHA, Y.R. Manejo integrado de enfermedades del trigo. Imprenta Landivar, Santa Cruz de la Sierra, Bolívia, 319 p., 1993.

MINUSSI, E.; MACHADO, C.C.; MENTEN, J.O.M.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.2, n.2, p.167-171, jul. 1977.

MOSCHEN, F. Caracterização da resistência genética à mancha amarela em genótipos de trigo. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo/UPF. Passo Fundo/RS, p. 152, 2008.

OGAWA, J. M.; MANJI, B. T.; EL-BEHADLI, A. H. Tolerance in plant pathogens to fungicides and bactericides. *Fungicide and Nematicide Tests*, London, v. 31, p. 3-8, 1976.

OU, S. H. Fungus diseases – Foliage Diseases. In: *Rice diseases*. England. 1 ed. 1972. p. 97-184.

PIANA, C.F.B. & PRESTES, A.M. Esporulação de *Stagnospora nodorum* em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira* 18:512-515. 1993.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Efeito do Tratamento de Sementes com Fungicidas sobre o Controle de Doenças na Parte Aérea do Trigo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 5, p.515-520, 2003.

PLATT, H. W.; MORRALL, R. A. A.; GRUEN, H. E. The effects of substrate, temperature, and photoperiod on conidiation of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Can. J. Bot.* 55:256-259, 1977.

PRESTES, A. M.; SANTOS, H. P. dos; REIS, E. M. Práticas culturais e incidência de manchas foliares em trigo. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília: v. 37, n. 6, p. 791-797, 2002.

QUEIROZ, F. M.; BATISTA, U. G.; BROMMNSCHENKE, S. H. Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Alternaria brasiliensis*. *Fitopatologia Brasileira* 29:541-543. 2004.

REES, R. G.; PLATZ, G. J. The occurrence and control of yellow spot of wheat in North-Eastern Australia. *Australian Journal Exp. Agricultural Anim. Husb.* 19: 369-372, 1979.

REES, R. G.; PLATZ, G. J. The epidemiology of yellow spot of wheat in Southern Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, v. 31, n. 2, p. 259-267, 1980.

REES, R.G.; PLATZ, G. J. Effects of Yellow Spot on Wheat: Comparison of Epidemics at Different Stages of Crop Development. *Australian Journal of Agricultural Research*, n. 34, p. 39-46, 1983.

REIS, E.M. Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil. *Plant Disease* 67: 68-70, 1983.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A. Controle cultural. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia. São Paulo: Ceres, 1995. p. 710-716.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; FORCELINI, C. A. Doenças do Trigo. In: KIMATI, H. et al. Manual de Fitopatologia - Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. 3 ed. São Paulo: Ceres, p. 725-735, 1997.

REIS, E.M.; MEDEIROS, C.A.; CASA, R.T. Control of leaf blights of wheat by elimination of inoculum source. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A (Org.) *Helminthosporium blights of wheat: spot blotch and tan spot*. México. p. 327-332, 1998.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; MEDEIROS, C. A. Diagnose, Patometria e Controle de Doenças de Cereais de Inverno. Londrina: E. S. Comunicação S/C Ltda, 2001, 94 p.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A.; REIS, A. C. Manual de Fungicidas: Guia para o Controle Químico de Doenças de Plantas. Florianópolis: Editora Insular, 2001b, 176 p.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Doenças do Trigo. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de Fitopatologia. Vol. 2, 4ta. Edição. p. 631-638, 2005.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Doenças dos cereais de inverno: diagnose, epidemiologia e controle. 2.ed. Lages: Graphel, 2007. 176 p.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A. REIS, A. C. Manual de fungicidas: guia para o controle de doenças de plantas. 5. ed. rev. ampl. Passo Fundo. Ed. Universidade de Passo Fundo, 2007. 153 p.

REIS, E.M; CASA, R.T. Critérios decisórios para o tratamento de sementes de cereais de inverno. In: Critérios indicadores do momento para aplicação de fungicidas visando ao controle de doenças em soja e trigo. Ed. Aldeia Norte. Passo Fundo, 148 p., 2009.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M.A. Manual de Fungicidas: Guia para o Controle Químico de Doenças de Plantas. Ed. Universidade de Passo Fundo, 6. ed., 2010, 226 p.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; DANELLI, A.L.D. Doenças do Trigo – Mancha-amarela da folha. Passo Fundo: Bayer CropScience. 2^o ed., 18p., 2011.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 17., 1985, Cruz Alta. Recomendações da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa do Trigo para a cultura do trigo em 1985. Cruz Alta: Fecotrigo-CEP, 1985. 55 p.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 22., 1990, Porto Alegre. Recomendações da Comissão Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo - 1990. Cruz Alta: FUNDACEP FECOTRIGO, 1990. 60 p.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 24.,1992, Cruz Alta. Recomendações da Comissão Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo-1992. Cruz Alta: FUNDACEP-FECOTRIGO, 1992. 47 p.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 31., 1999, Passo Fundo. Recomendações da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo - 1999. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 86 p.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 37., 2005, Cruz Alta. Indicações técnicas da Comissão Sul-

Brasileira de Pesquisa de Trigo: trigo e triticales - 2005. Cruz Alta: FUNDACEP, 2005. 162 p.

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALES, 5., 2011, Dourados. Informações técnicas para trigo e triticales - safra 2012. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 204 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistema de produção, 9).

RODRIGUES, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, n.3, p.323-327, 2007.

RUPPEL, E.G. Factors affecting conidial dimensions of a *Drechslera* species. Mycologia 66:803-807. 1974.

RUSSEL, P. E. *Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management*. FRAC Monograph n° 3, Cambridge CB2 5AN, UK, 2004.

RUSSEL, P. Taking the path of least resistance – what resistance is, why it is a problem and what we can do to combat it. *Pesticide Outlook*., v.14, part 2, p. 57-61, 2003.

SANTANA, F. M.; CLEBSCH, C. C.; LAZZAROTTO, A. Avaliação da eficiência de controle da mancha-amarela em duas cultivares de trigo da Embrapa Trigo, safra 2010. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 16 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 127). Disponível: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do127.htm>.

SANTOS, P. H.; REIS, E. M.; VIEIRA, S. A.; PEREIRA, L. R. Rotação de Culturas e Produtividade de Trigo no RS. Passo Fundo: Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, 1987, 32 p.

SARTORATO, A. Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. Pesquisa Agropecuária Tropical, 36 (3): 211-213, 2006.

SARTORI, J.E. & Maringoni, A.C. Effect of fungicides on colony growth of *Colletotrichum lindemuthianum* (SACC. & MAGN.) SCRIB. Journal of Plant Protection Research. vol. 48, no. 2, 2008.

SCHUBIGER, F. X.; BOLLER, B. Blattfleckenkrankheiten der Gräser in der Schweiz. Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Reckenholzstrasse 191, Zürich, 2009.

SHARVELLE, E. G. The nature and uses of modern fungicides. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1961, 308 p.

SHOEMAKER, R.A. *Drechslera* Ito. Canadian Journal of Botany 40: p. 809-836, 1962.

SHOEMAKER, R.A. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from "*Helminthosporium*". Canadian Journal of Botany 37: 879-887, 1959.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the Assistat - Statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p. 393-396.

SILVA, J. C.; MEYER, M. C.; COUTINHO, W. C.; SUASSUNA, E. D. Fungitoxicidade de grupos químicos sobre *Myrothecium roridum* *in vitro* e sobre a mancha-de-mirotécio em algodoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, n. 5, p. 755-761, 2006.

SMILEY, R.W.; DERNOEDEN P.H.; CLARKE B.B. Compendium of Turfgrass Diseases. APS Press Third Edition: 167 p. 2005.

SOARES, R. M.; CASTRO, R. L. Avaliação de Doenças Foliares nos STAUB, T.; SOZZI, D. Fungicide Resistance. *Plant Disease*, v. 86, n. 12, p. 1026-1031, 1984.

STOLTE, R.E. Sensibilidade de *Bipolaris sorokiniana* e de *Drechslera tritici-repentis* a fungicidas *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade de Passo Fundo/UPF. Passo Fundo/RS, 2006.

STRANDBERG, J.O. Isolation, storage, and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.7, p.1008-1012, 1987.

TARR, S.A.J. & KAFI, A. Growth, sporulation and conidial characteristics of five graminicolous species of *Helminthosporium*: II. Effect of nitrogen and pH. *Transactions British Mycological Society* 51: 771-777. 1968.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L. G.; ARIAS, S. M. S.; MACHADO, J. da C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v.25, n°6, p. 1314-1320, nov./dez., 2001.

TONIN, R.B.; REIS, E.M. Incidência de *Drechslera* sp. em folhas de trigo. In: XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. *Tropical Plant Pathology* 34 (Suplemento), Resumo 490 (Epidemiologia), 2009.

TORGESON, D. C. Determination and Measurement of Fungitoxicity. In: Torgeson, D. C. *Fungicides: An Advanced Treatise*, v. 1. New York: Academic Press, 1967, 742 p.

TUITE, J. Plant pathological methods – Fungi and bacterial. Department of Botany and Plant Pathology. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1969.

WIESE, M.V. Compendium of wheat diseases. American Phytopathological Society, St. Paul 1977. 106p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Isolado 01/QTZ

Tabela 1. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória que inibe 50% do crescimento miceliano de *Drechslera tritici-repentis*, Isolado 01/QTZ

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|---------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Ciproconazol | $y = -5,00 \text{ Ln}(x) + 80,68$ | 94,0 | > 40 | I |
| Epoxiconazol | $y = -11,7 \text{ Ln}(x) + 53,66$ | 96,0 | 1,37 | MS |
| Propiconazol | $y = -12,7 \text{ Ln}(x) + 48,02$ | 98,0 | 0,86 | AS |
| Protioconazol | $y = -10,9 \text{ Ln}(x) + 31,37$ | 96,0 | 0,18 | AS |
| Tebuconazol | $y = -10,2 \text{ Ln}(x) + 56,21$ | 91,0 | 1,84 | MS |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração (mg/L) calculada pela equação.

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

APÊNDICE 2 – Isolado 02/ONX

Tabela 2. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória que inibe 50% do crescimento micelial de *Drechslera tritici-repentis* (CI_{50}), Isolado 02/ONX

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|---------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Ciproconazol | $y = -7,23 \text{ Ln}(x) + 74,12$ | 89,0 | 28,11 | BS |
| Epoxiconazol | $y = -10,0 \text{ Ln}(x) + 39,52$ | 95,0 | 0,35 | AS |
| Propiconazol | $y = -12,0 \text{ Ln}(x) + 52,99$ | 96,0 | 1,28 | MS |
| Protioconazol | $y = -10,7 \text{ Ln}(x) + 30,16$ | 95,0 | 0,16 | AS |
| Tebuconazol | $y = -10,9 \text{ Ln}(x) + 59,27$ | 90,0 | 2,34 | MS |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

APÊNDICE 3 – Isolado 03/HTZ

Tabela 3. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória que inibe 50% do crescimento micelial de *Drechslera tritici-repentis* (CI_{50}), Isolado 03/HZT

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|---------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Ciproconazol | $y = -4,07 \text{ Ln}(x) + 85,74$ | 81,0 | > 40 | I |
| Epoxiconazol | $y = -11,0 \text{ Ln}(x) + 51,10$ | 96,0 | 1,11 | MS |
| Propiconazol | $y = -11,4 \text{ Ln}(x) + 41,90$ | 99,0 | 0,49 | AS |
| Protioconazol | $y = -11,4 \text{ Ln}(x) + 32,30$ | 94,0 | 0,21 | AS |
| Tebuconazol | $y = -10,6 \text{ Ln}(x) + 56,33$ | 95,0 | 1,82 | MS |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

APÊNDICE 4 – Isolado 04/GUA

Tabela 4. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória que inibe 50% do crescimento micelial de *Drechslera tritici-repentis* (CI_{50}), Isolado 04/GUA

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|---------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Ciproconazol | $y = -4,63 \text{ Ln}(x) + 83,17$ | 90,0 | > 40 | I |
| Epoxiconazol | $y = -9,86 \text{ Ln}(x) + 45,52$ | 95,0 | 0,63 | AS |
| Propiconazol | $y = -12,3 \text{ Ln}(x) + 41,57$ | 98,0 | 0,50 | AS |
| Protioconazol | $y = -9,52 \text{ Ln}(x) + 27,16$ | 96,0 | 0,09 | AS |
| Tebuconazol | $y = -11,4 \text{ Ln}(x) + 53,88$ | 96,0 | 1,41 | MS |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

APÊNDICE 5 – Isolado 05/CD

Tabela 5. Fungicida, equação, coeficiente de determinação (R^2), sensibilidade e concentração inibitória que inibe 50% do crescimento micelial de *Drechslera tritici-repentis* (CI_{50}), Isolado 05/CD

| Fungicida | Equação de regressão* | R^2 | CI_{50}^{**} | S^1 |
|---------------|-----------------------------------|-------|----------------|-------|
| | | (%) | (mg/L) | |
| Ciproconazol | $y = -6,47 \text{ Ln}(x) + 72,83$ | 98,0 | 34,08 | BS |
| Epoxiconazol | $y = -10,3 \text{ Ln}(x) + 41,85$ | 97,0 | 0,45 | AS |
| Propiconazol | $y = -11,9 \text{ Ln}(x) + 51,89$ | 96,0 | 1,17 | MS |
| Protioconazol | $y = -11,1 \text{ Ln}(x) + 30,33$ | 92,0 | 0,17 | AS |
| Tebuconazol | $y = -11,1 \text{ Ln}(x) + 58,82$ | 94,0 | 2,21 | MS |

*y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida ** Concentração calculada pela equação (mg/L).

¹Sensibilidade de *Drechslera tritici-repentis* ao fungicida: AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível).

APÊNDICE 6 – Fungicida azoxistrobina

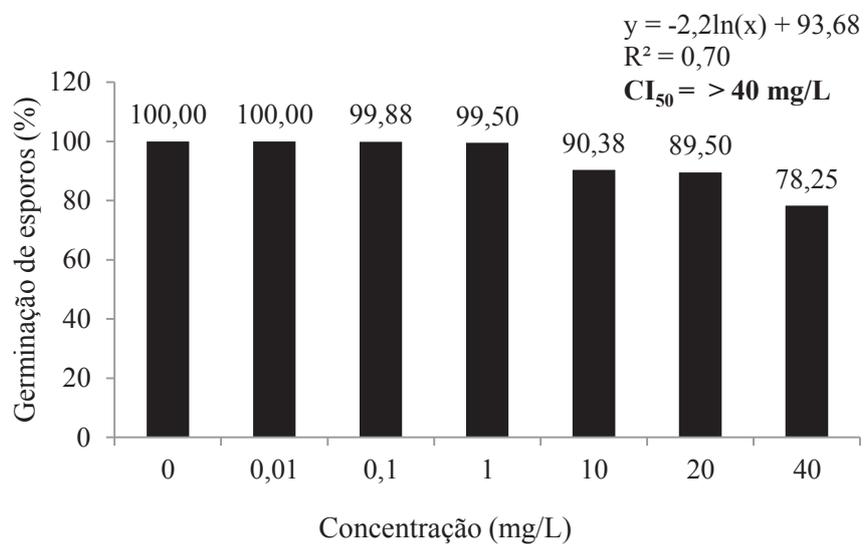


Figura 1. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 01/QTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

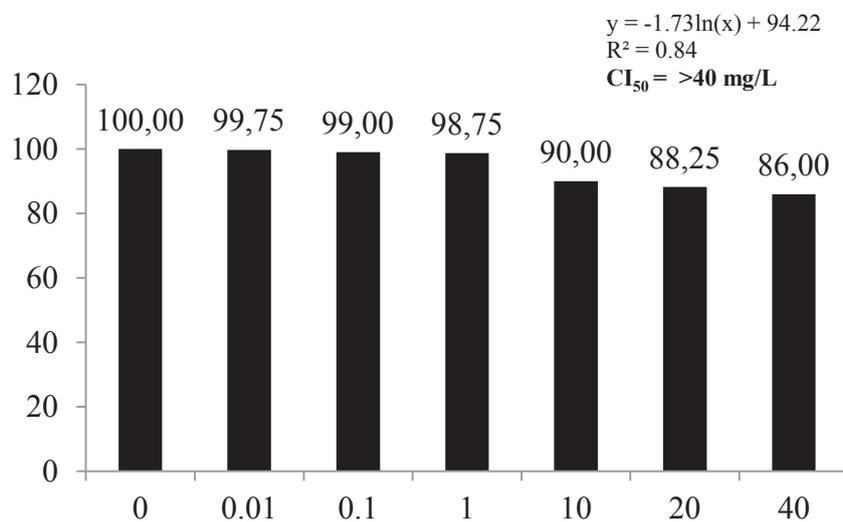


Figura 2. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 02/ONX, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

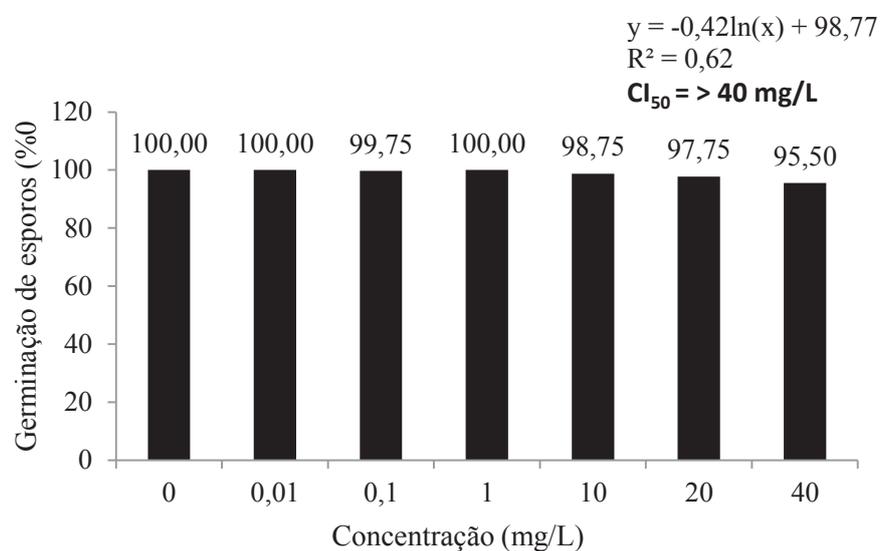


Figura 3. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 03/HTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

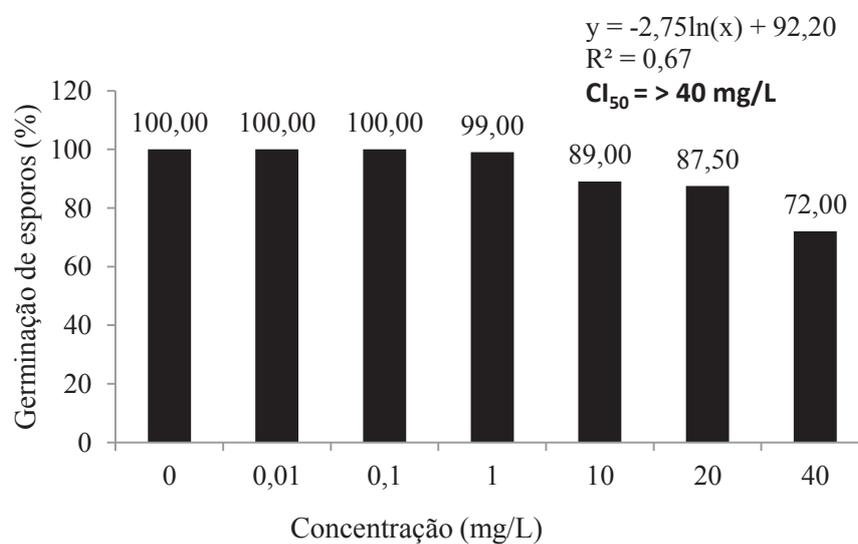


Figura 4. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 04/GUA, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

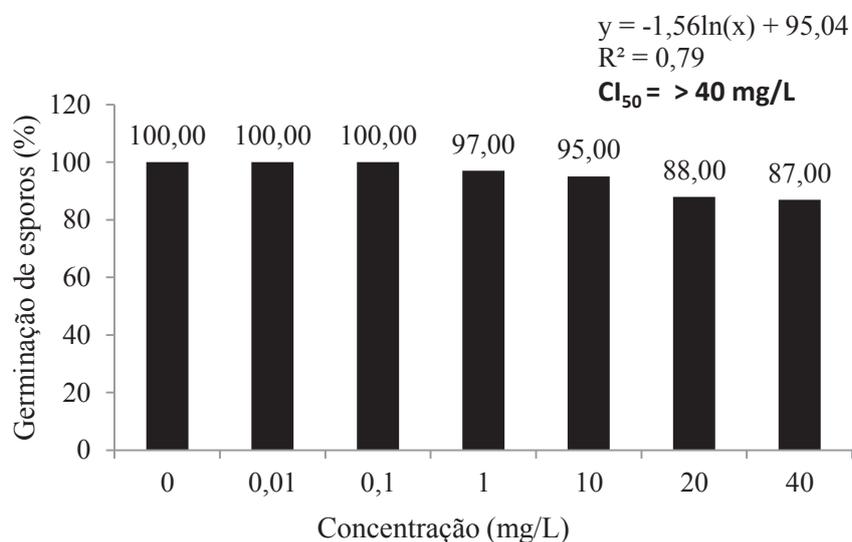


Figura 5. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 05/CD, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

APÊNDICE 7 – Fungicida cresoxim-metílico

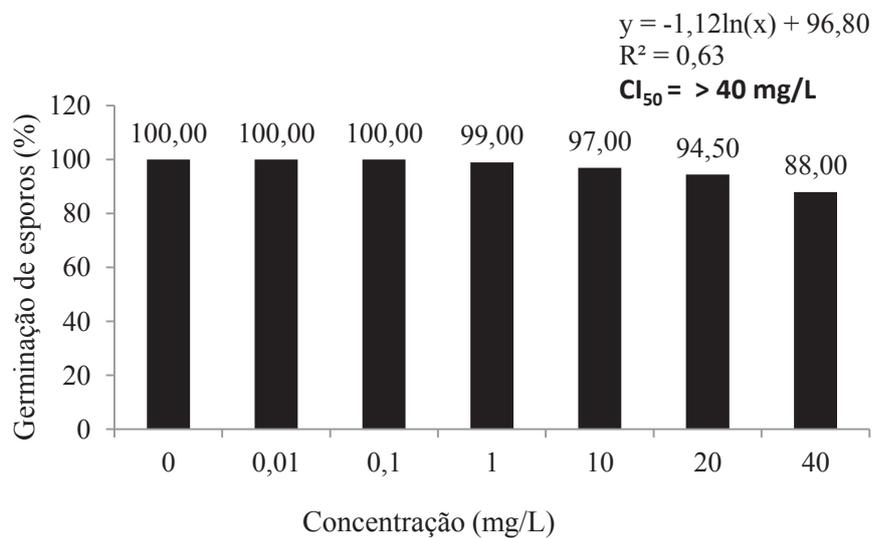


Figura 6. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 01/QTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida cresoxim-metílico.

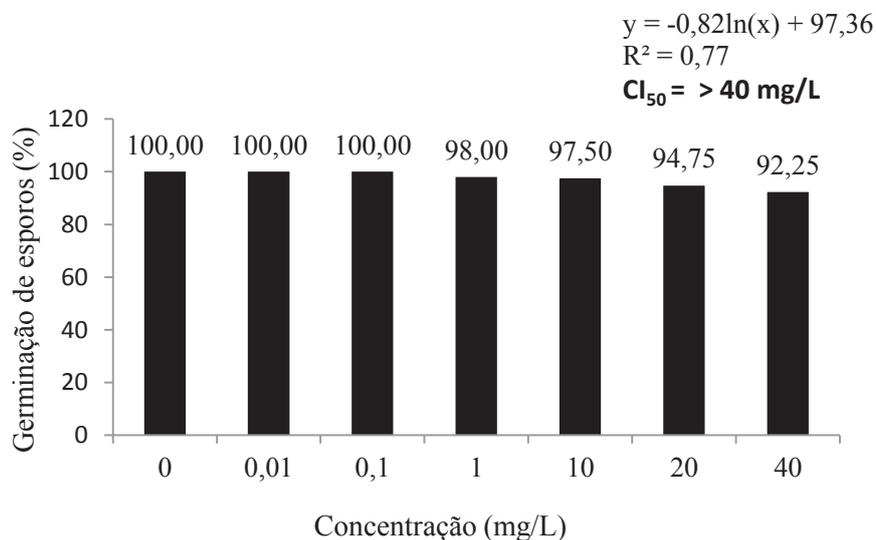


Figura 7. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 02/ONX, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida cresoxim-metilico.

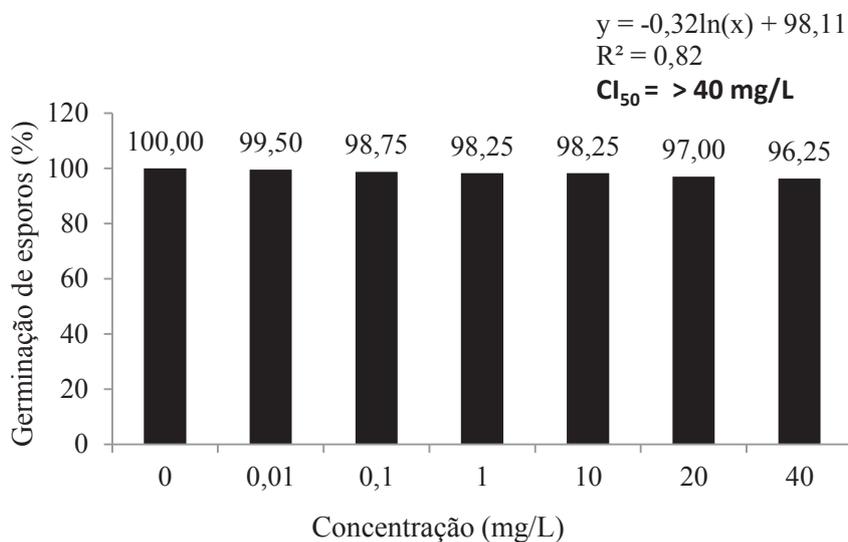


Figura 8. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 03/HTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida cresoxim-metilico.

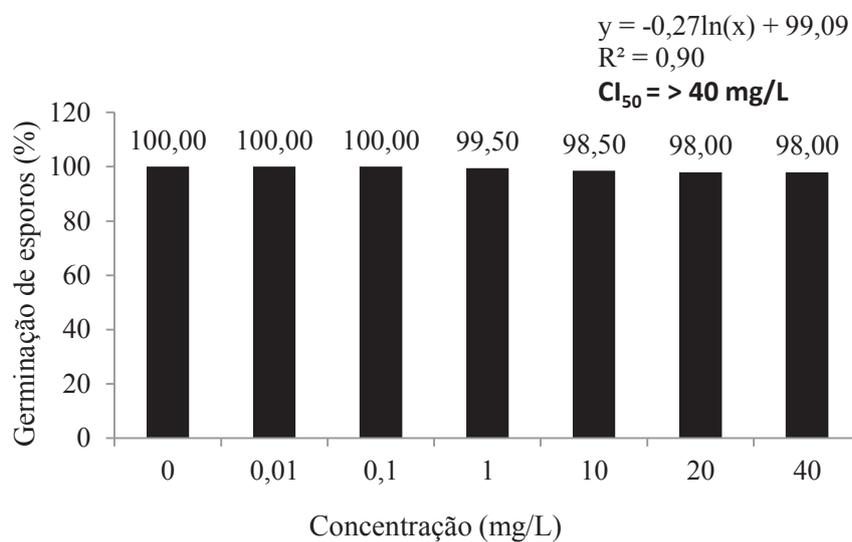


Figura 9. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 04/GUA, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida cresoxim-metilico.

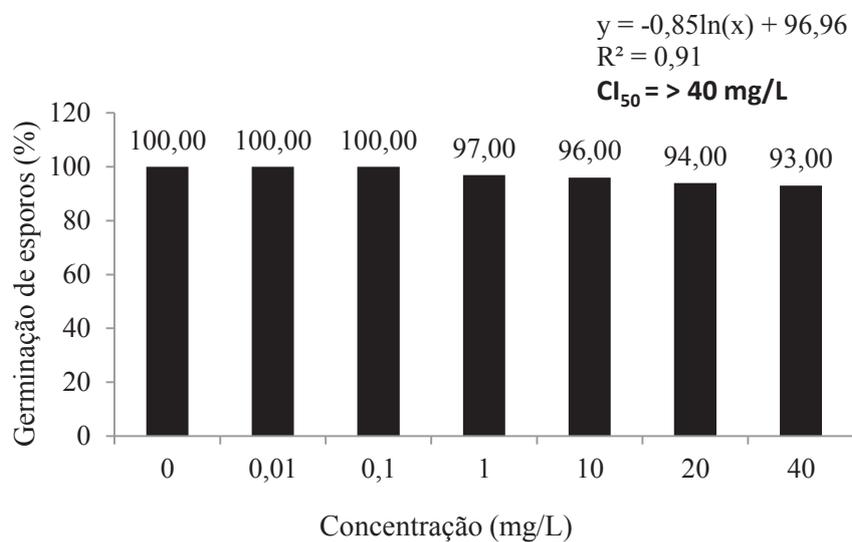


Figura 10. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 05/CD, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida cresoxim-metilico.

APÊNDICE 8 – Fungicida picoxistrobina

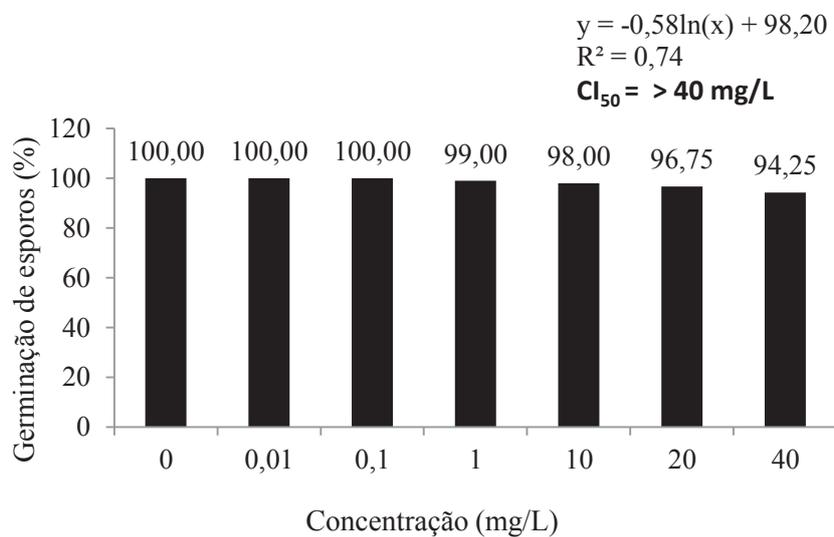


Figura 11. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 01/QTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

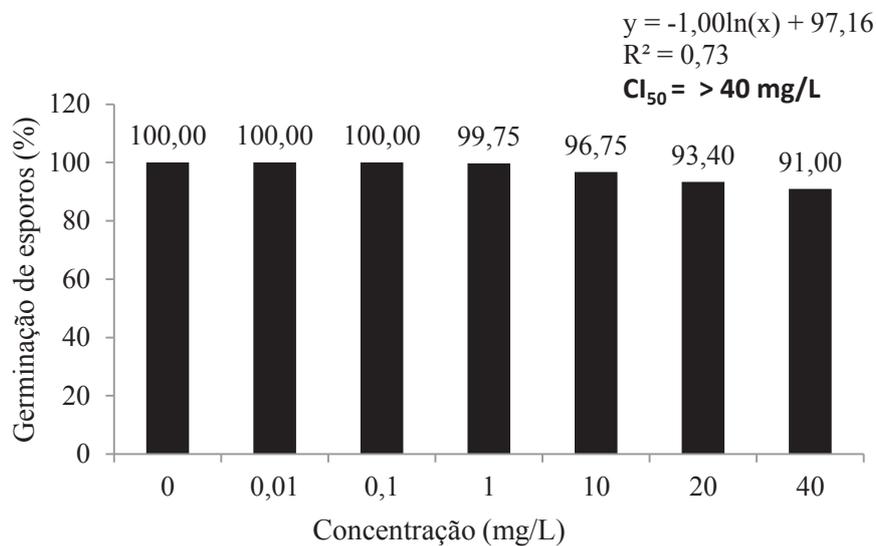


Figura 12. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 02/ONX, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

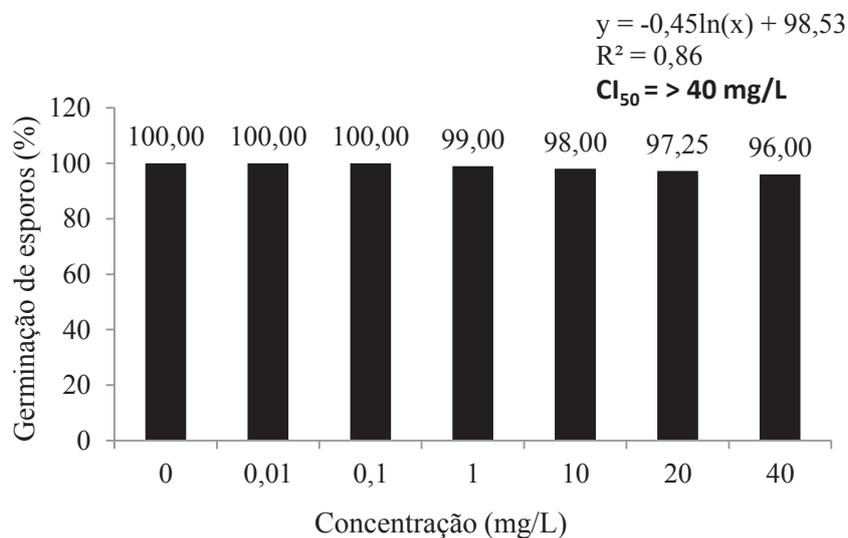


Figura 13. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 03/HTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

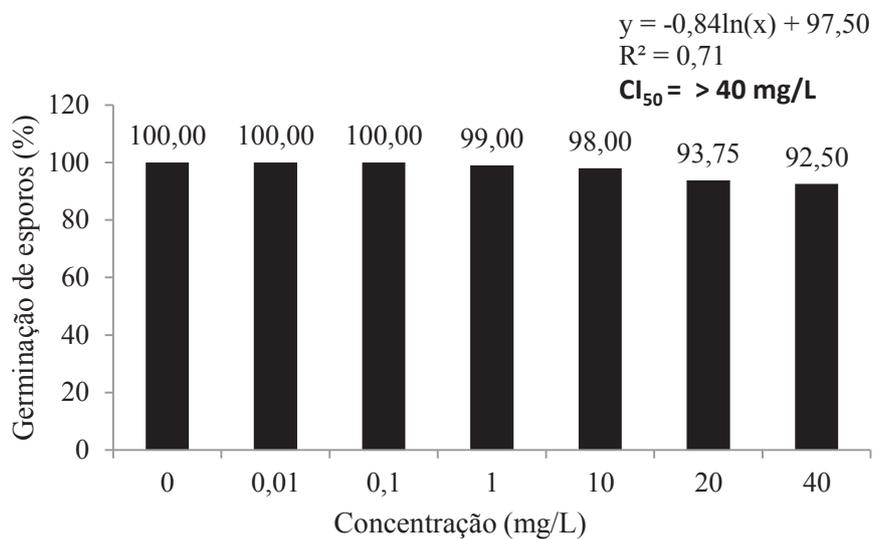


Figura 14. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 04/GUA, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

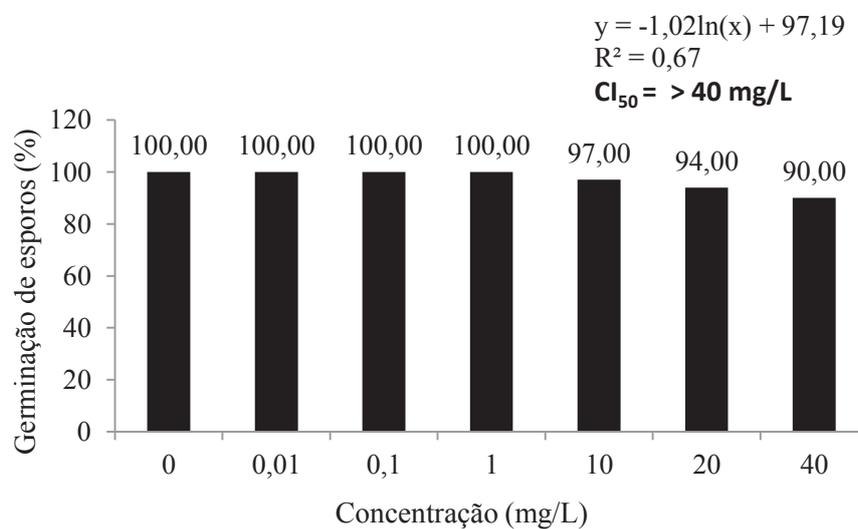


Figura 15. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 05/CD, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

APÊNDICE 9 – Fungicida piraclostrobina

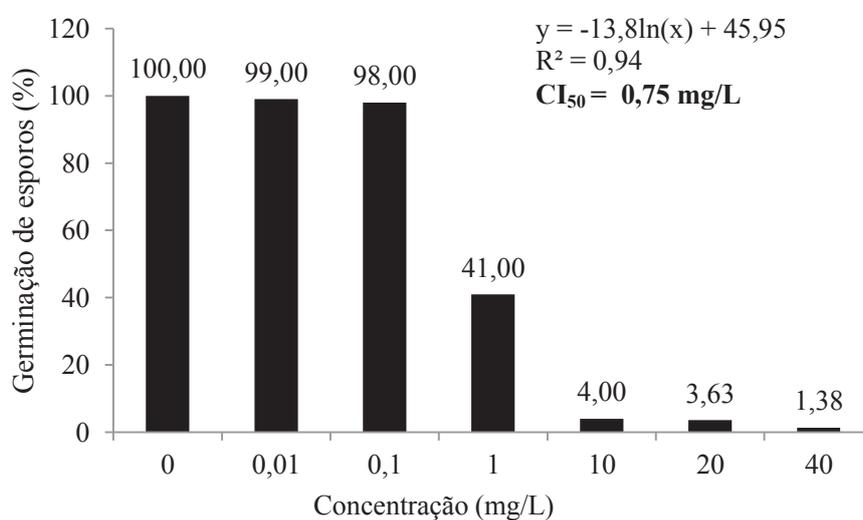


Figura 16. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 01/QTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina.

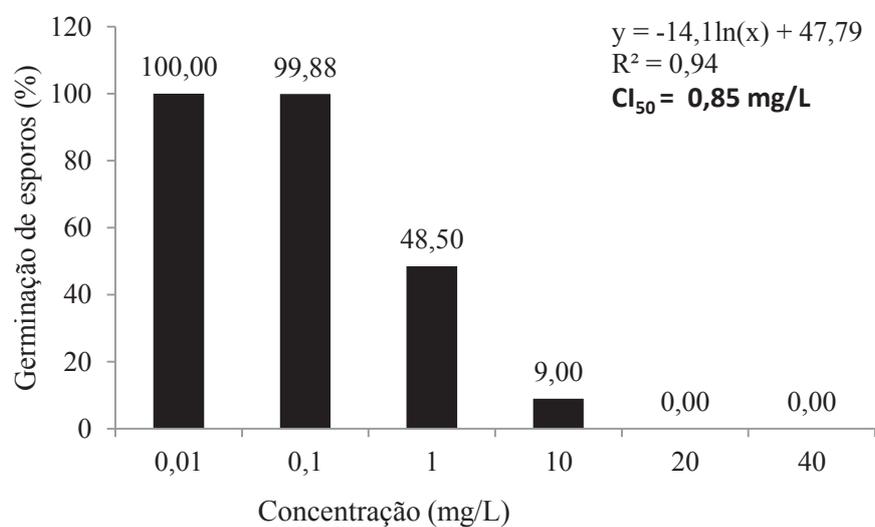


Figura 17. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 02/ONX, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina.

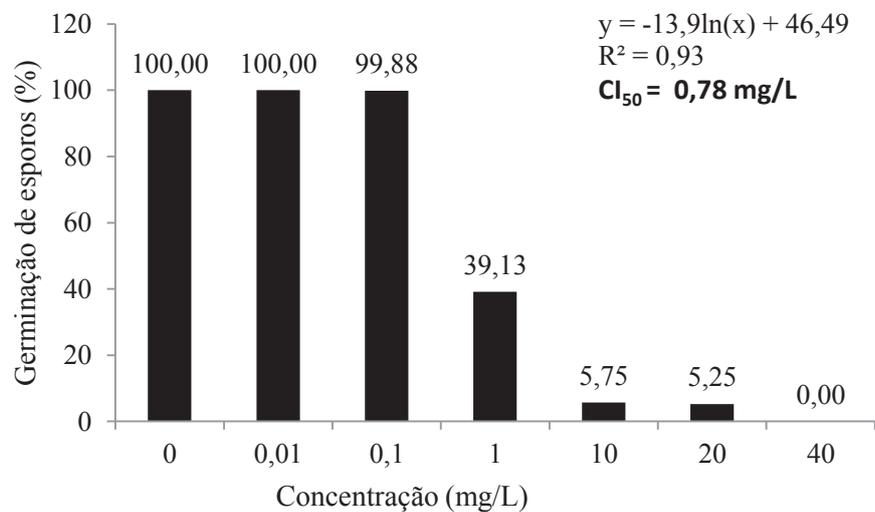


Figura 18. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 03/HTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina.

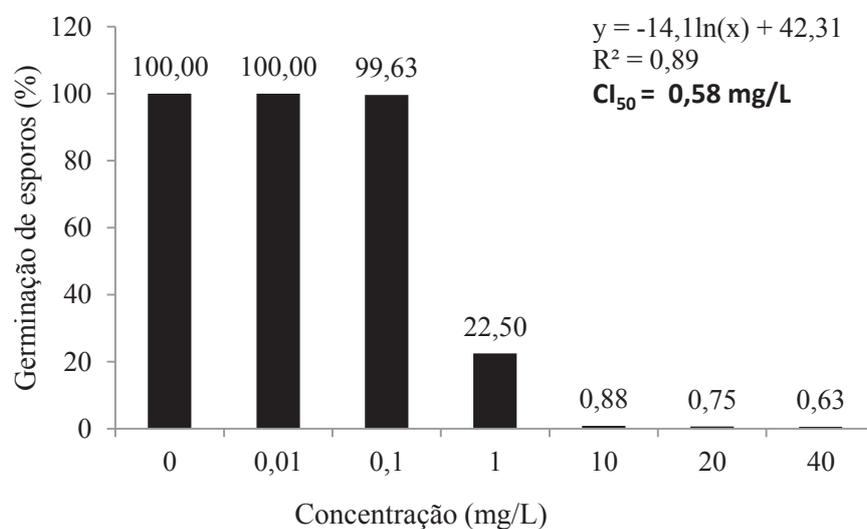


Figura 19. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 04/GUA, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina.

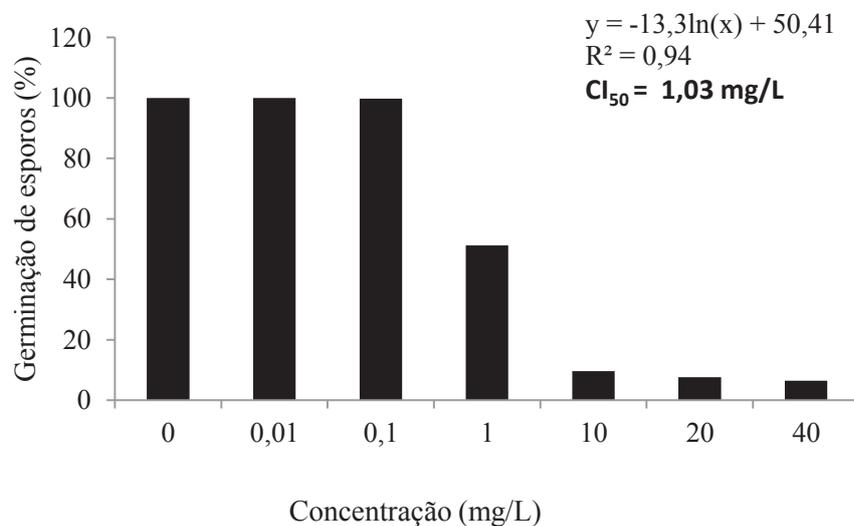


Figura 20. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 05/CD, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina.

APÊNDICE 10 – Fungicida trifloxistrobina

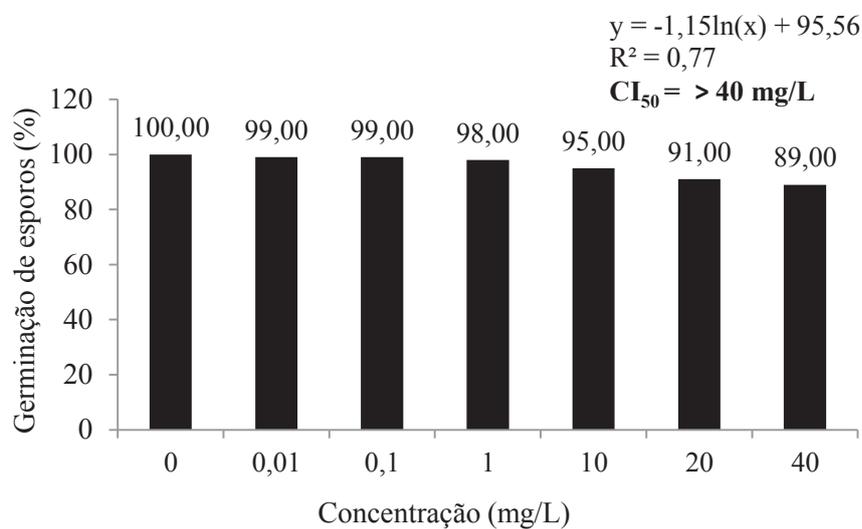


Figura 21. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 01/QTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

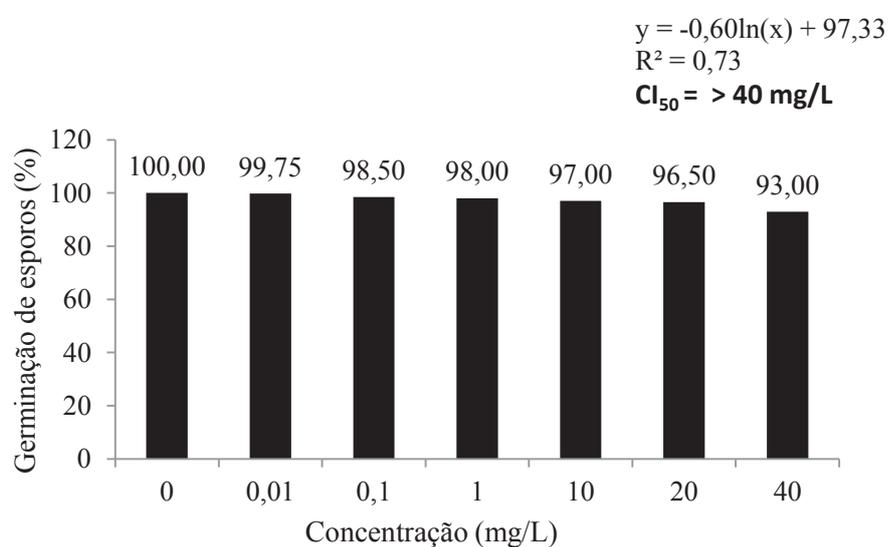


Figura 22. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 02/ONX, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

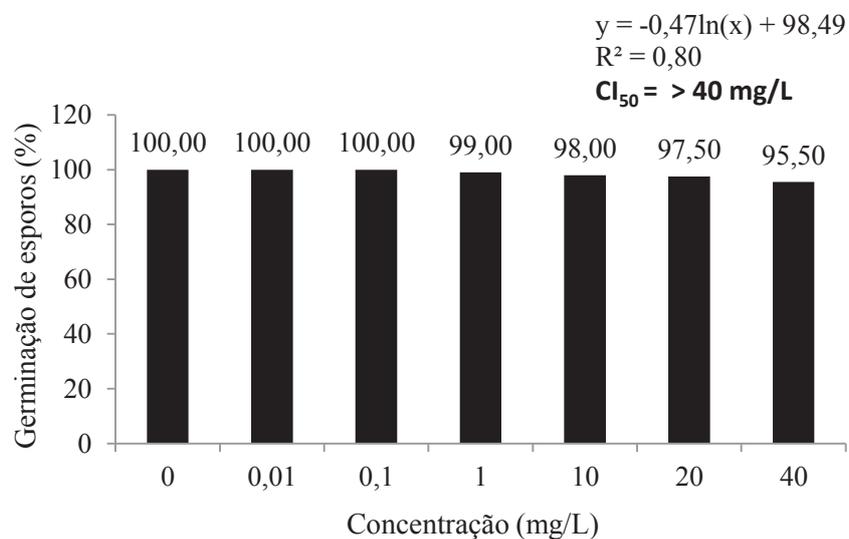


Figura 23. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 03/HTZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

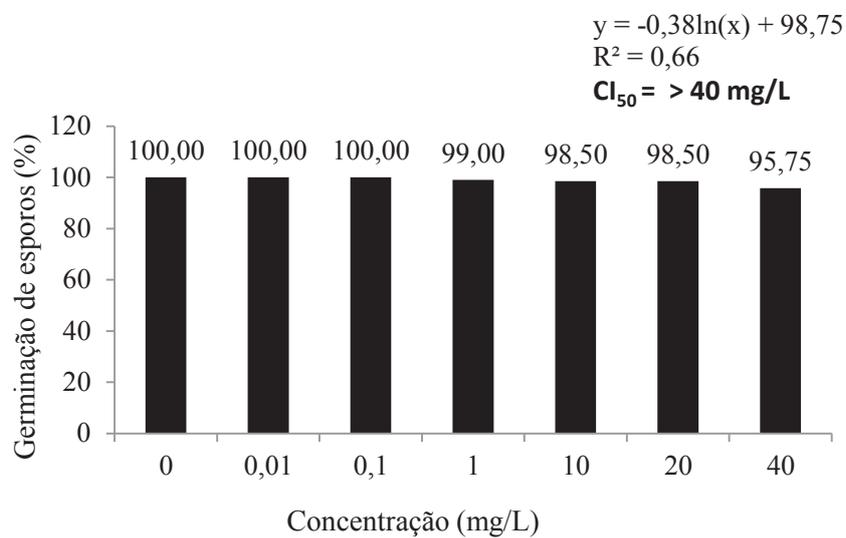


Figura 24. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 04/GUA, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

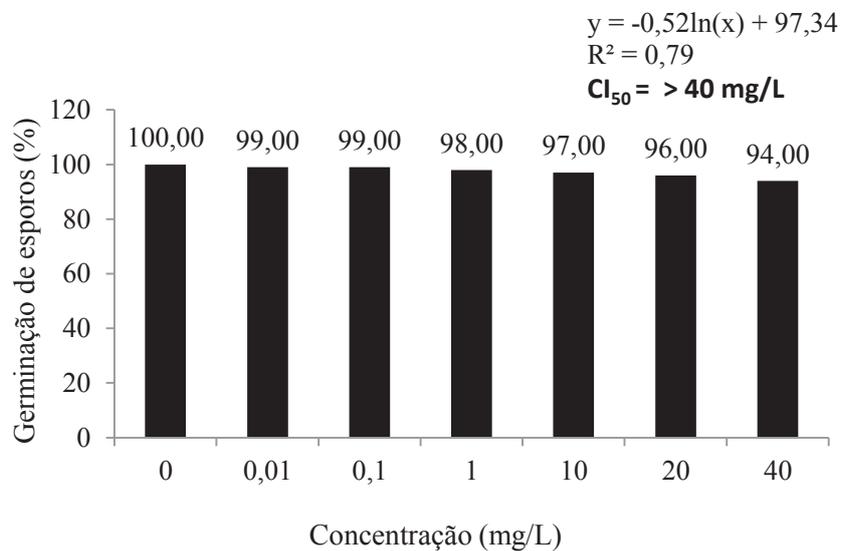


Figura 25. Germinação de esporos (%) de *Drechslera tritici-repentis*, para o isolado de trigo 05/CD, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

APÊNDICE 11 – Fungicida ciproconazol

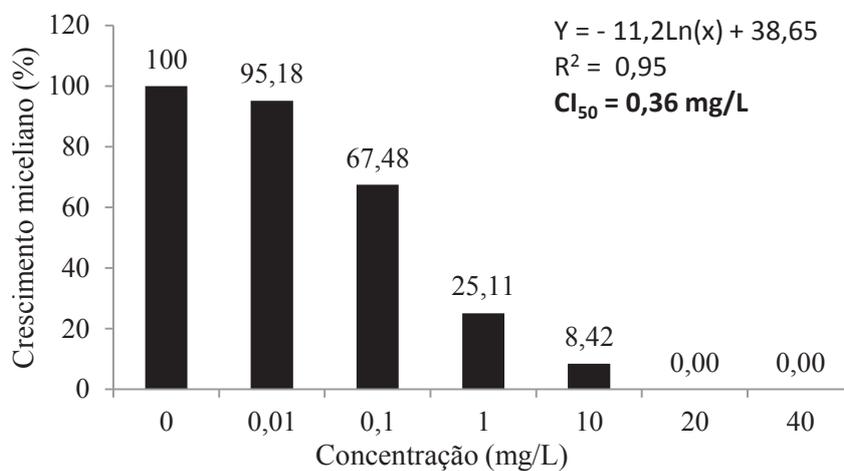


Figura 1. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol.

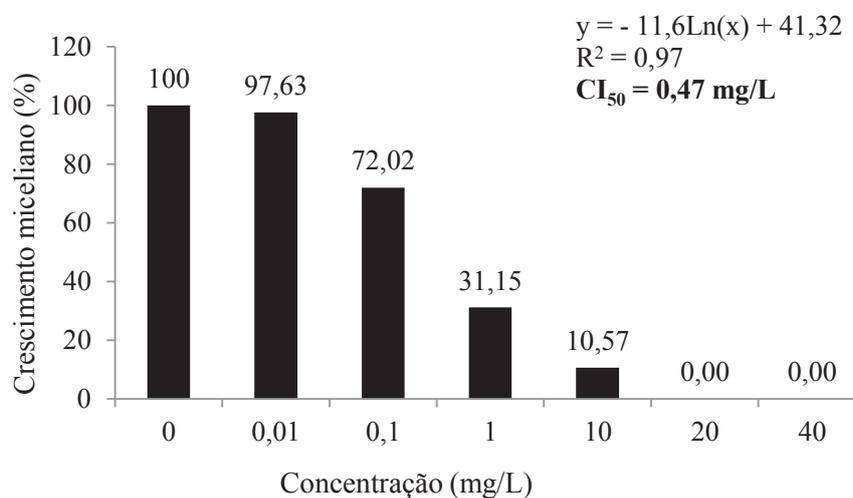


Figura 2. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol.

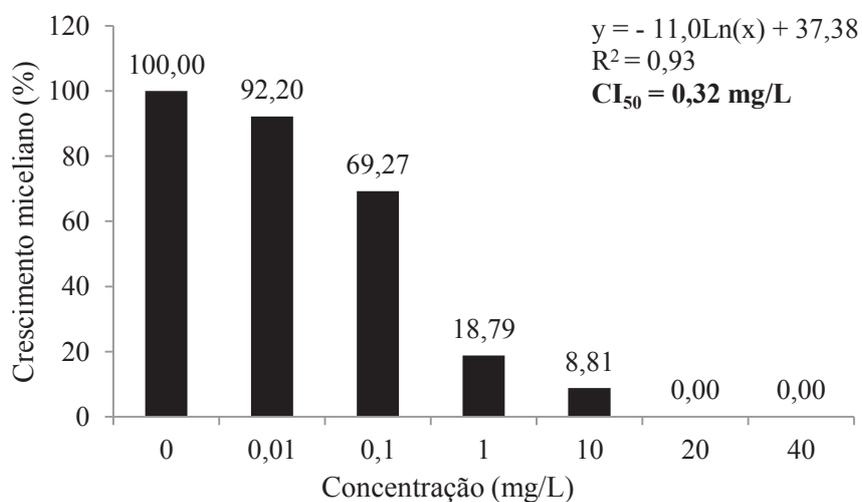


Figura 3. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol.

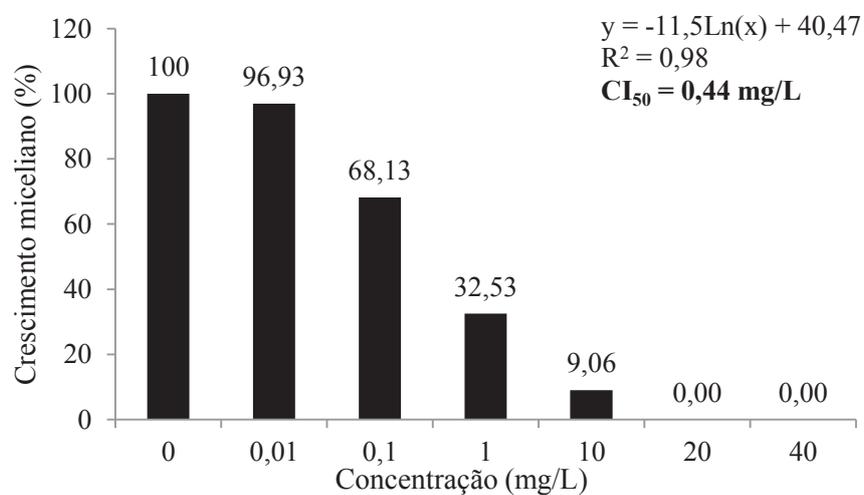


Figura 4. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol.

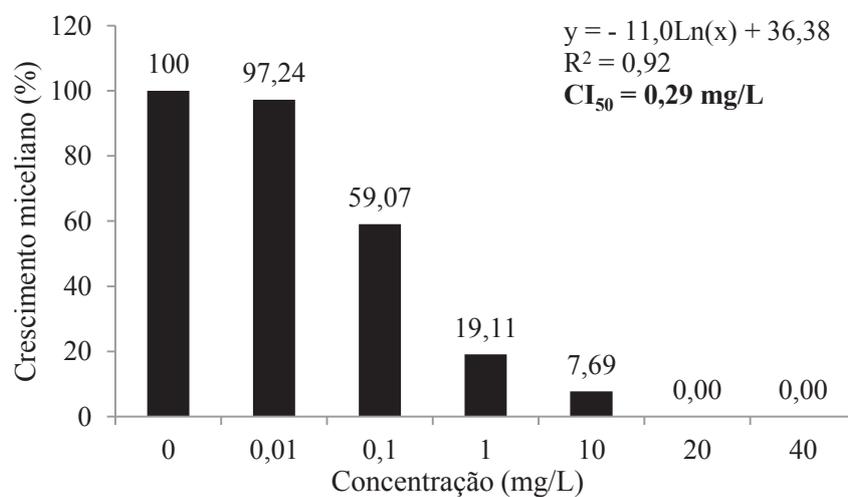


Figura 5. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol.

APÊNDICE 12 – Fungicida epoxiconazol

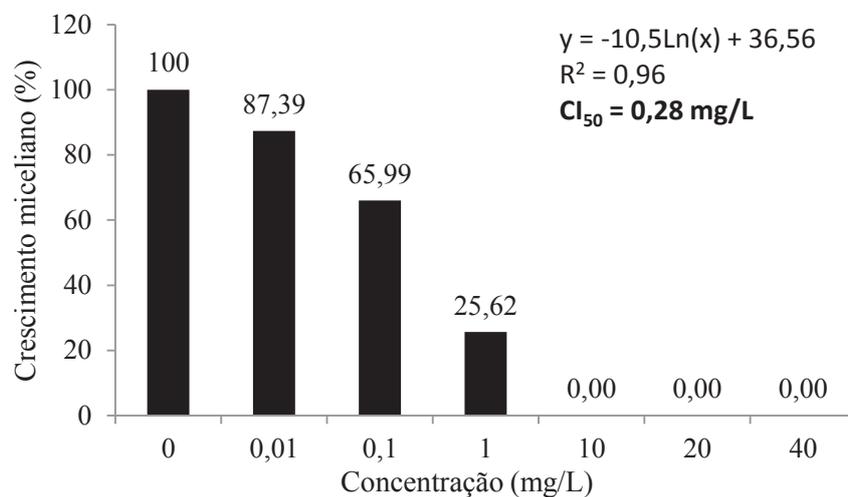


Figura 6. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol.

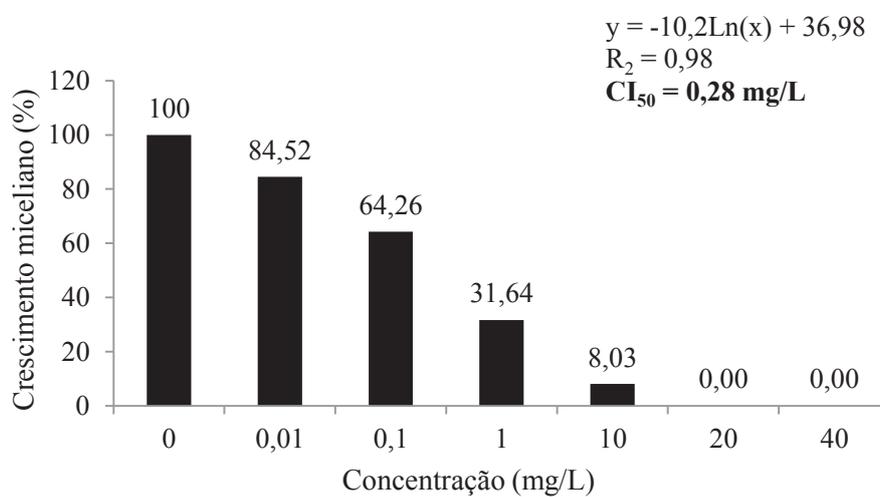


Figura 7. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol.

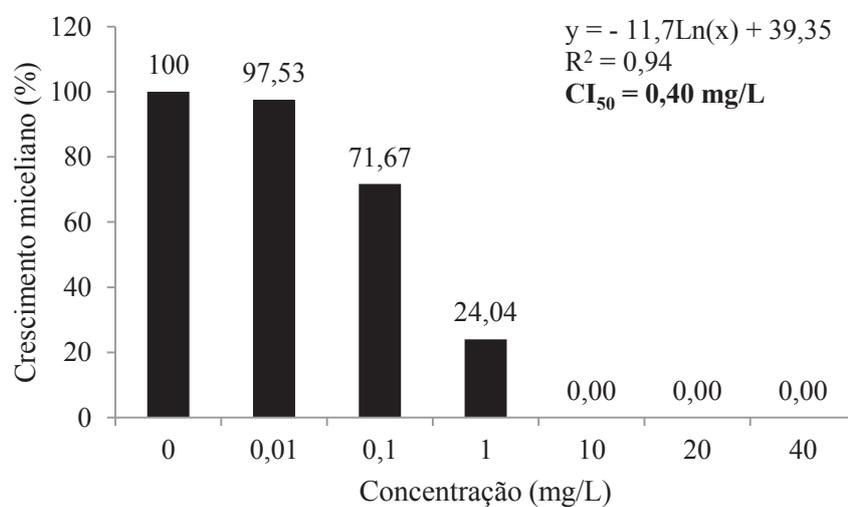


Figura 8. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol.

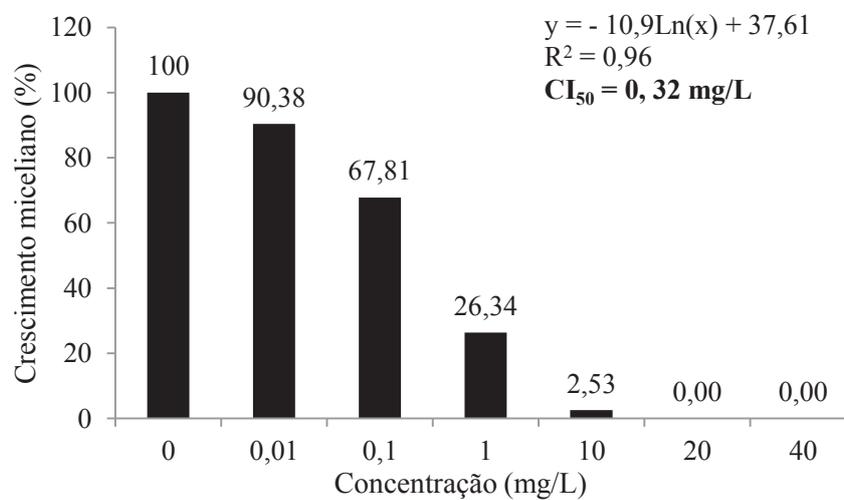


Figura 9. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol.

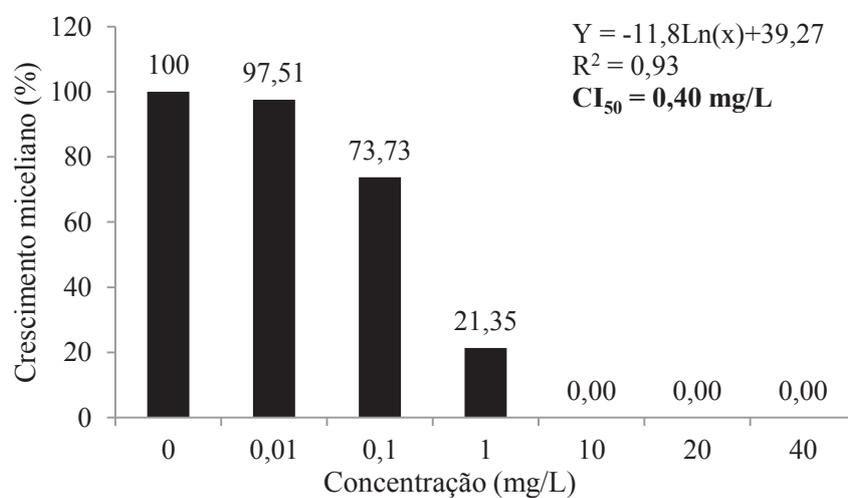


Figura 10. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol.

APÊNDICE 13 – Fungicida propiconazol

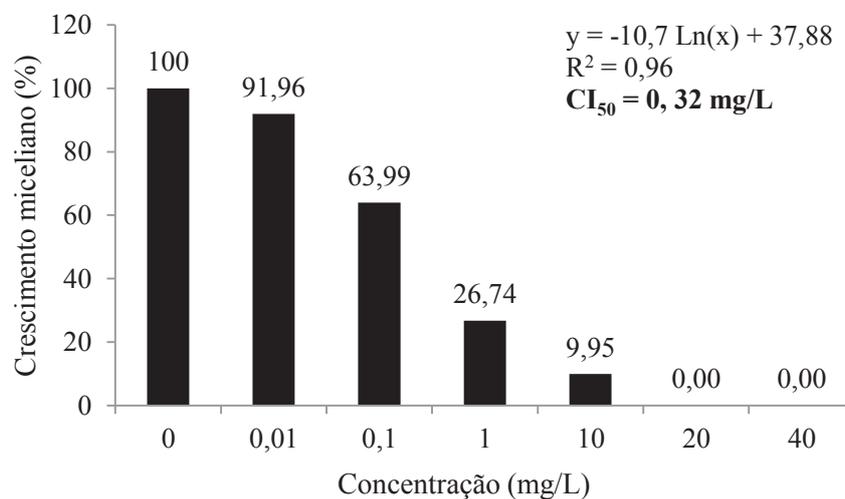


Figura 11. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida propiconazol.

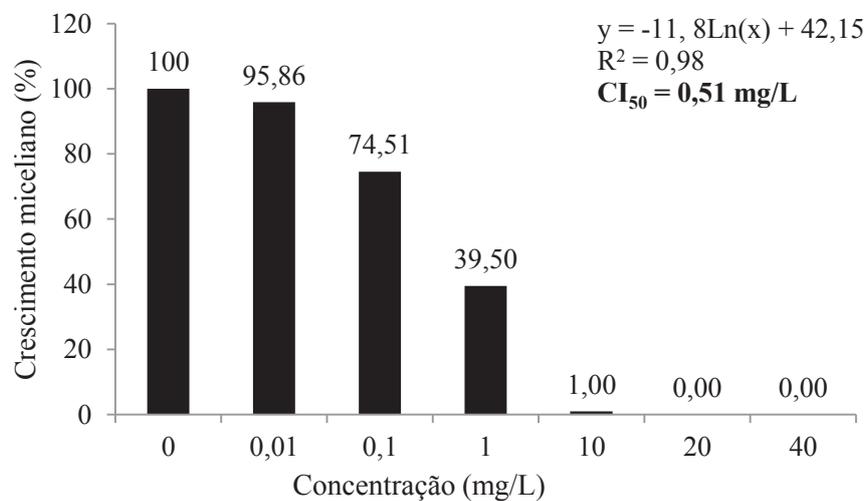


Figura 12. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida propiconazol.

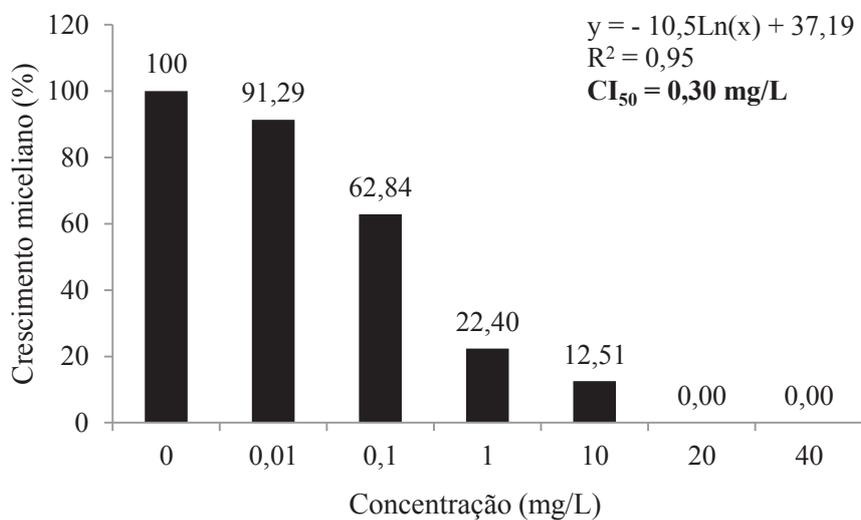


Figura 13. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida propiconazol.

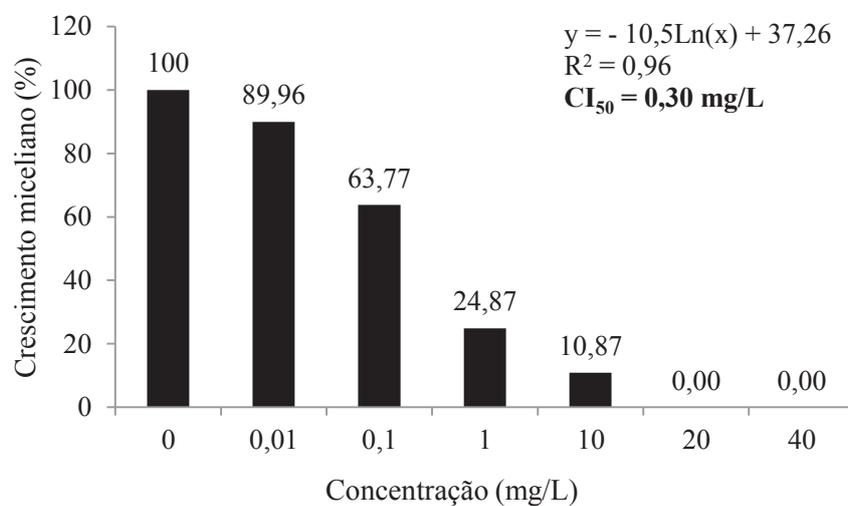


Figura 14. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida propiconazol.

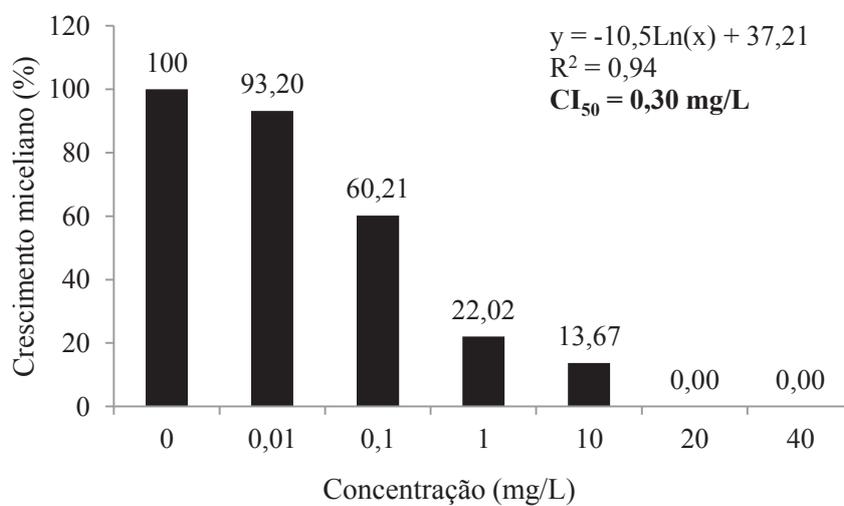


Figura 15. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida propiconazol.

APÊNDICE 14 – Fungicida protioconazol

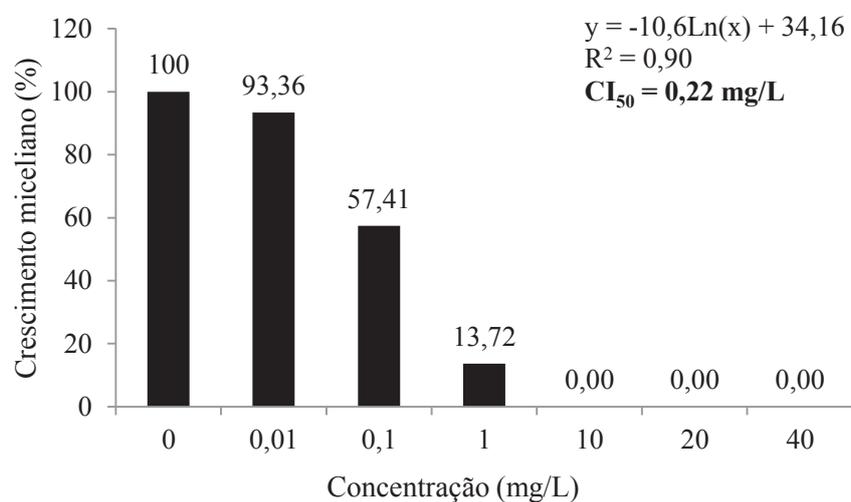


Figura 16. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccas*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida protioconazol.

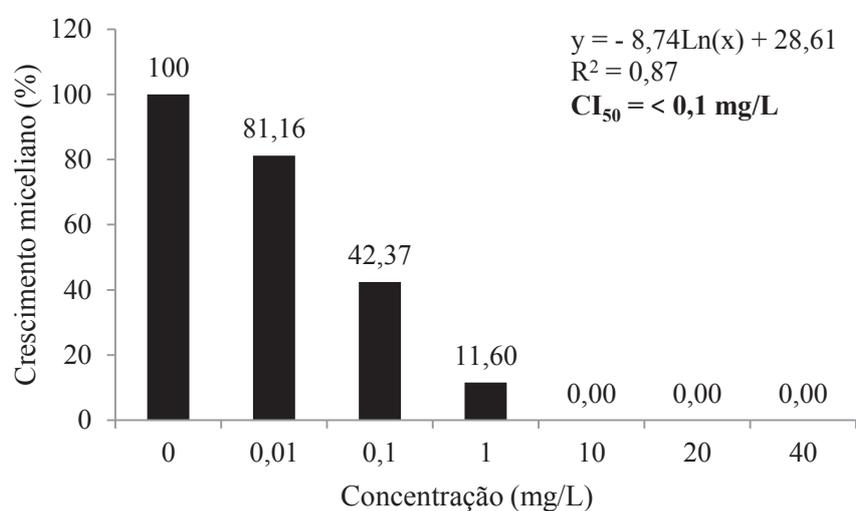


Figura 17. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccas*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida protioconazol.

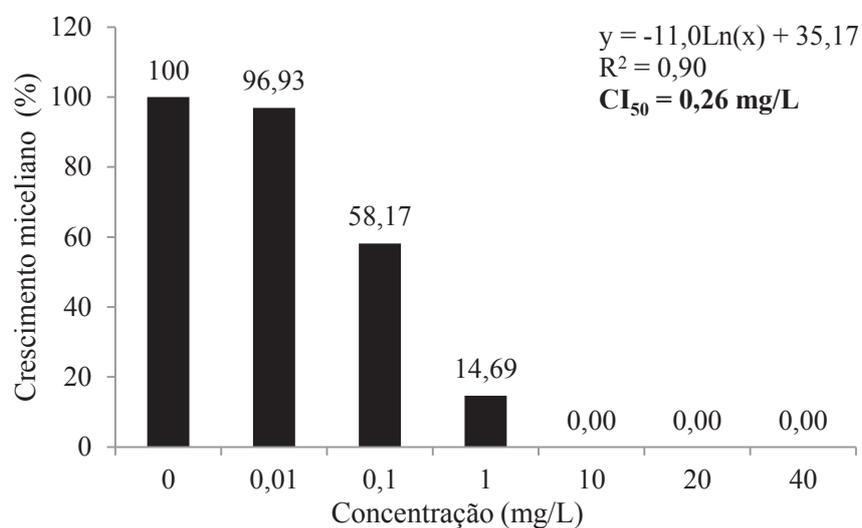


Figura 18. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida prothioconazol.

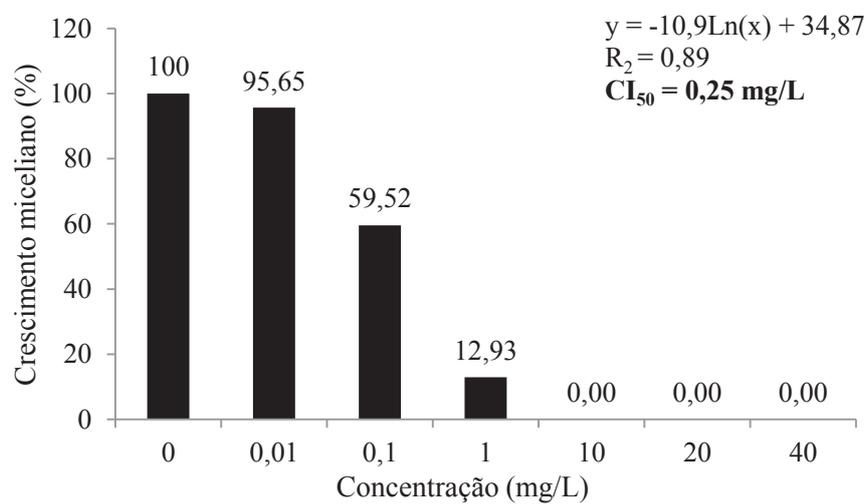


Figura 19. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida prothioconazol.

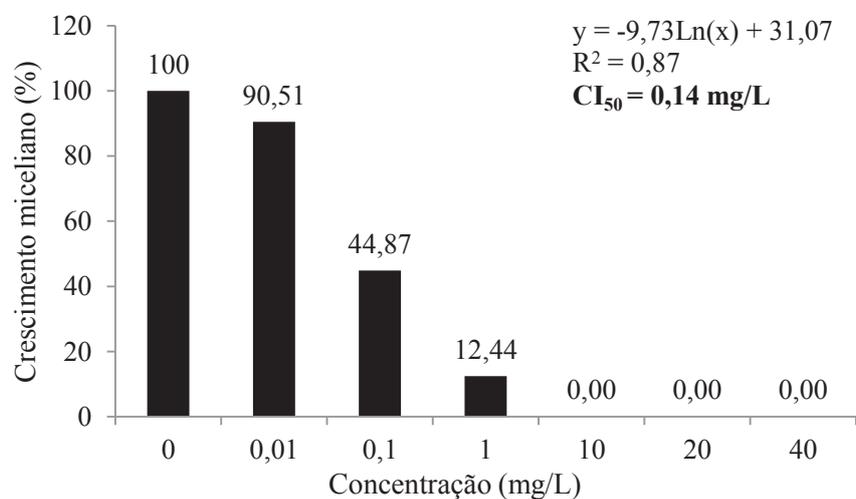


Figura 20. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccas*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida prothioconazol.

APÊNDICE 15 – Fungicida tebuconazol

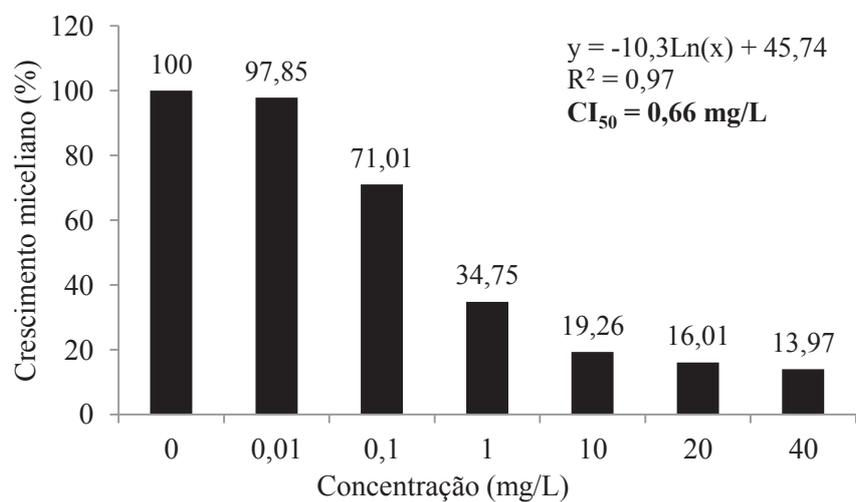


Figura 21. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccas*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol.

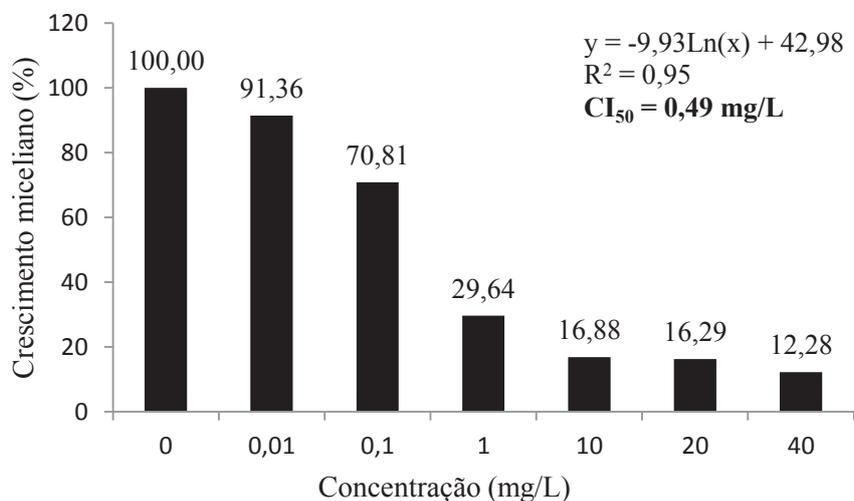


Figura 22. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol.

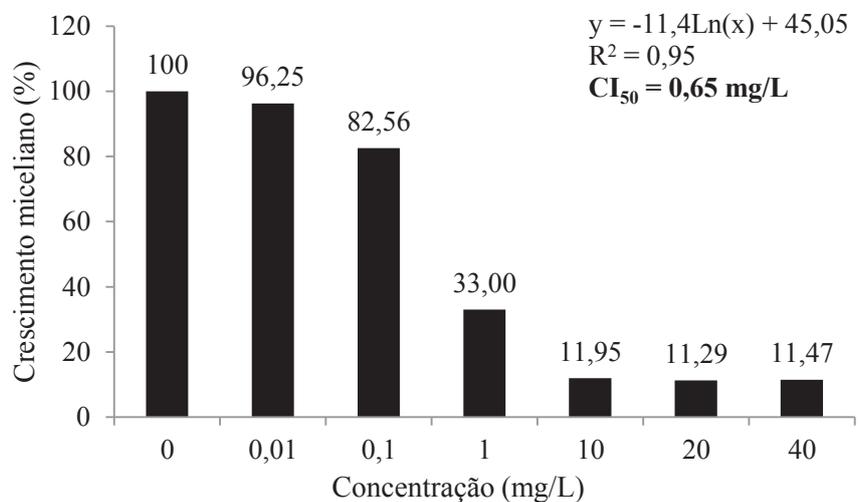


Figura 23. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol.

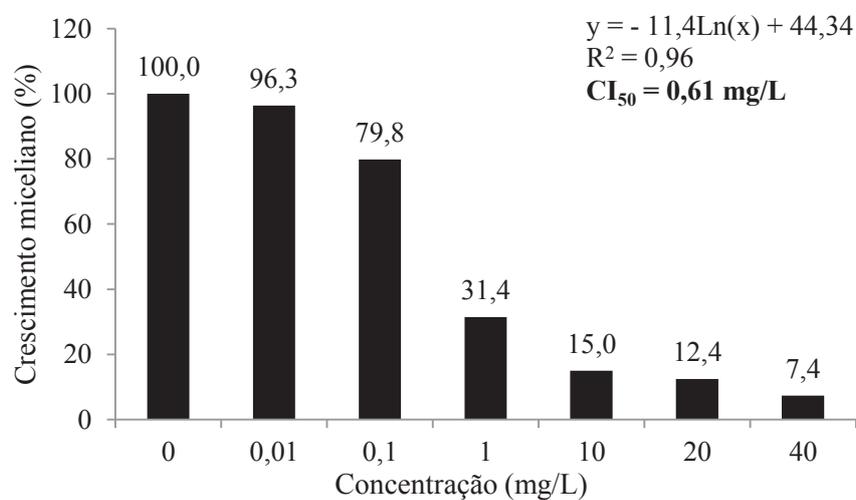


Figura 24. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol.

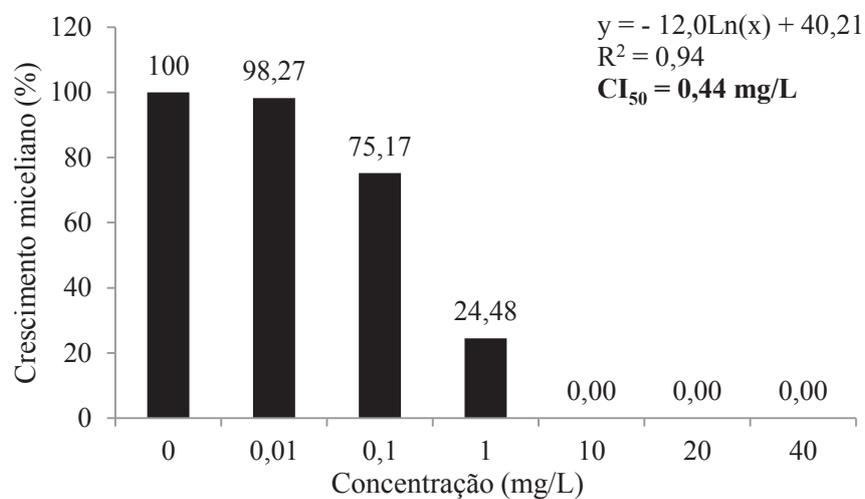


Figura 25. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol.

APÊNDICE 16 – Fungicida azoxistrobina

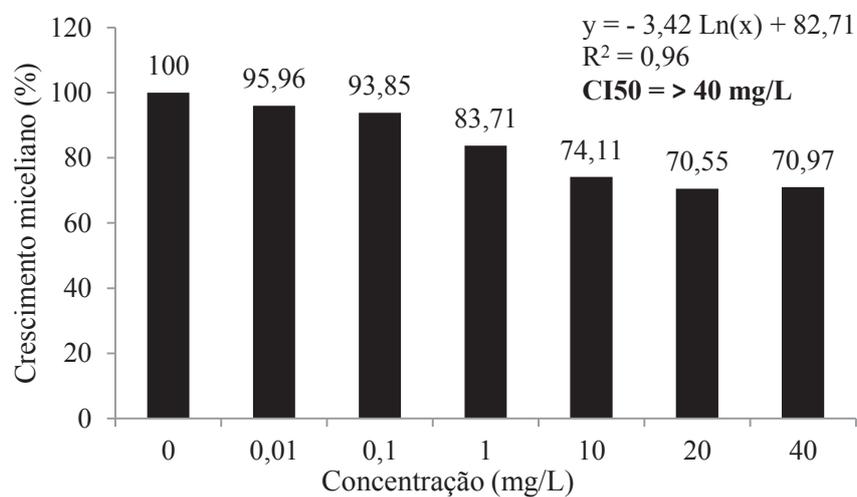


Figura 26. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

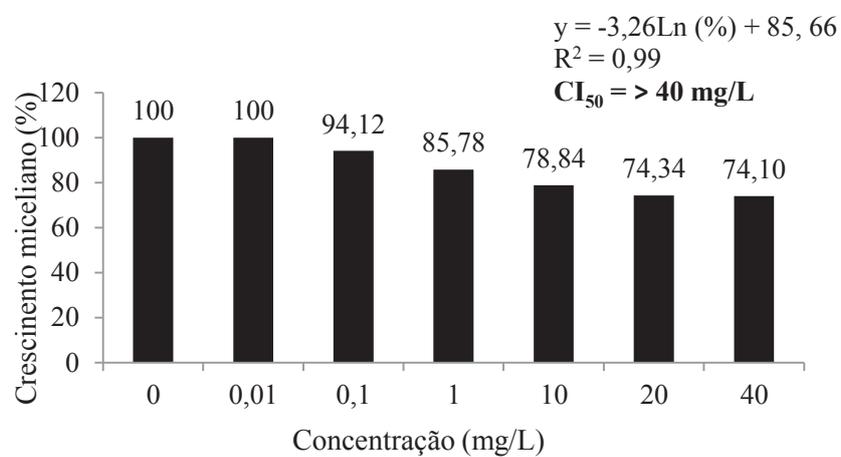


Figura 27. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

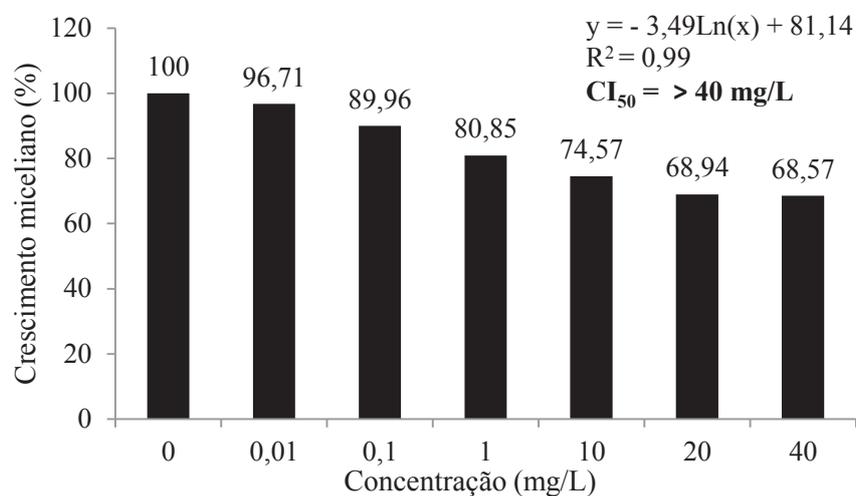


Figura 28. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

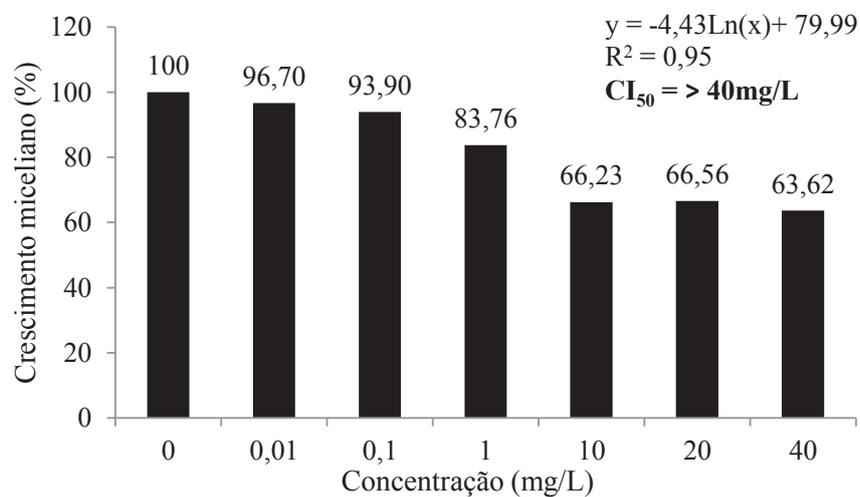


Figura 29. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina

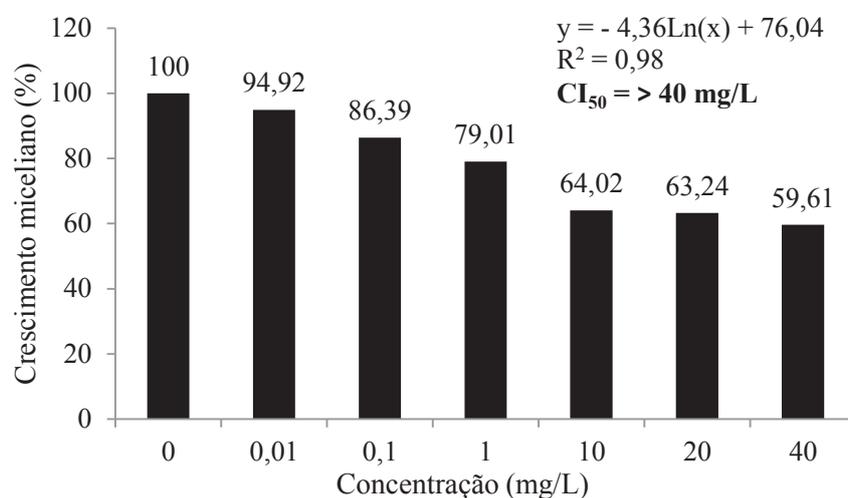


Figura 30. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina.

APÊNDICE 17 – Fungicida picoxistrobina

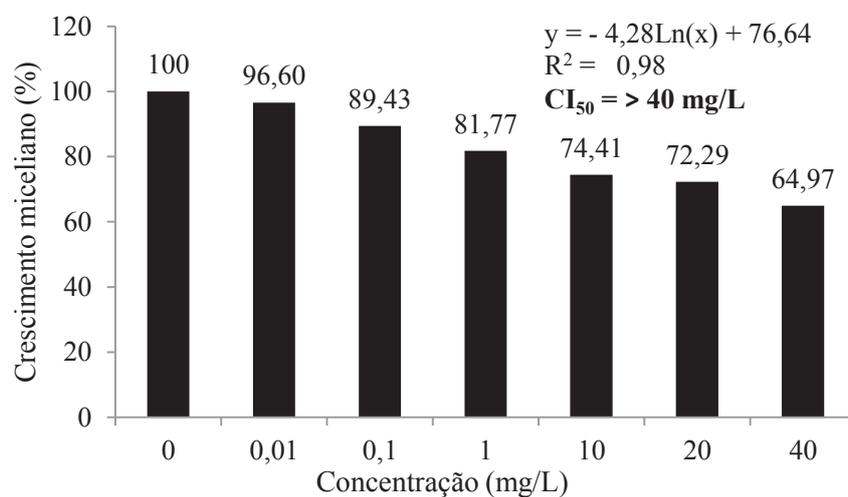


Figura 31. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

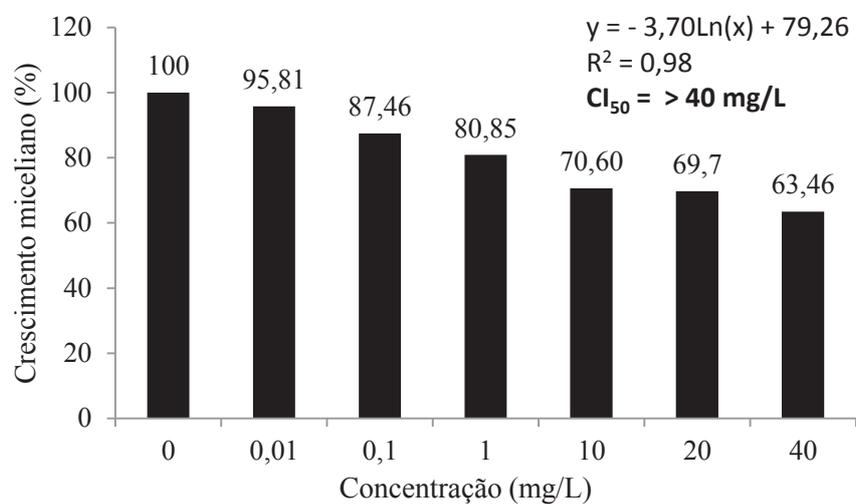


Figura 32. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

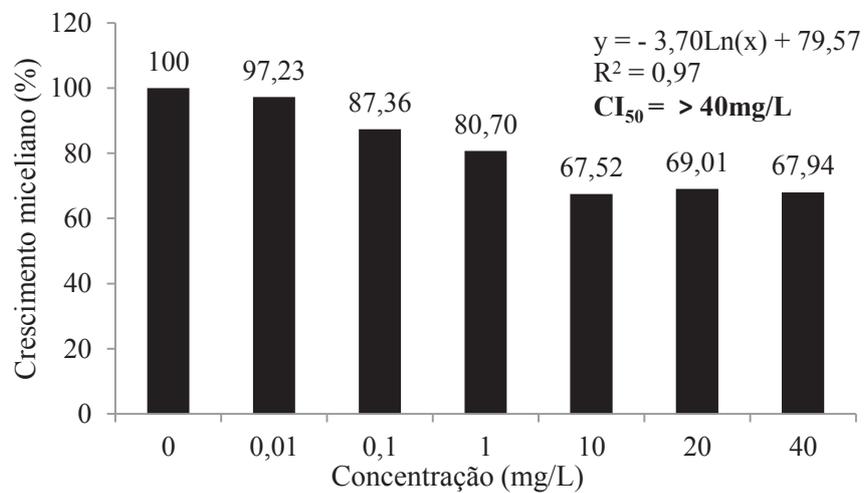


Figura 33. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

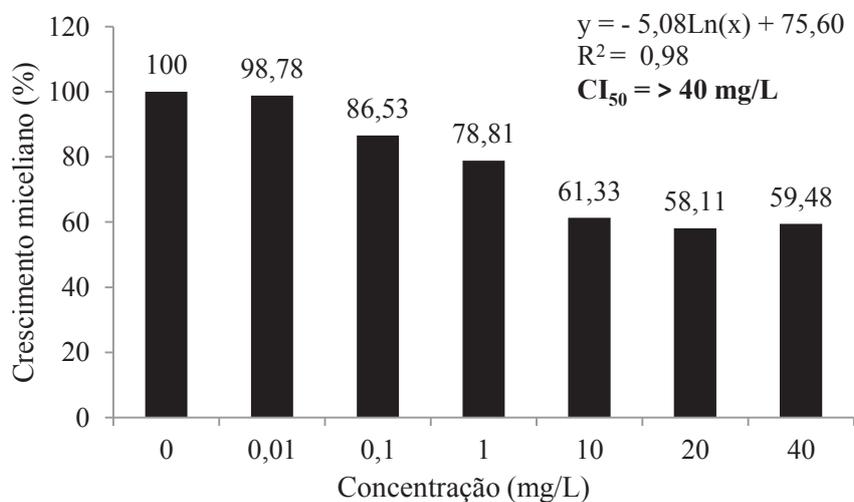


Figura 34. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

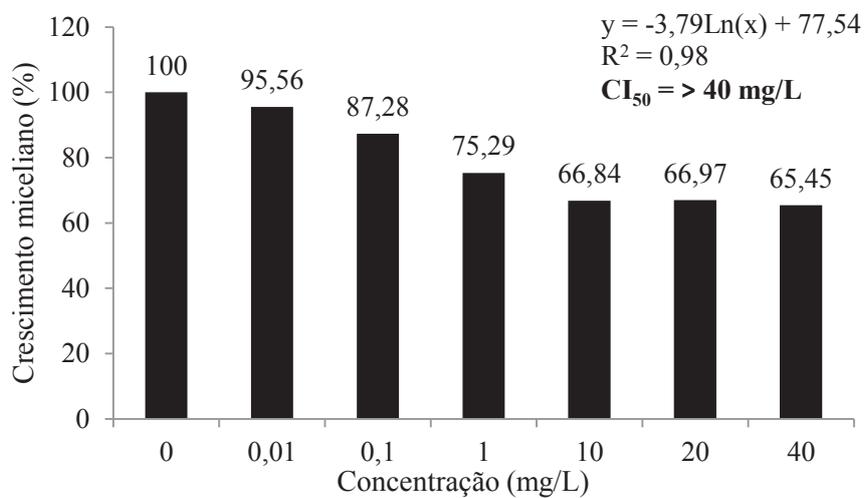


Figura 35. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina.

APÊNDICE 18 – Fungicida piraclostrobina

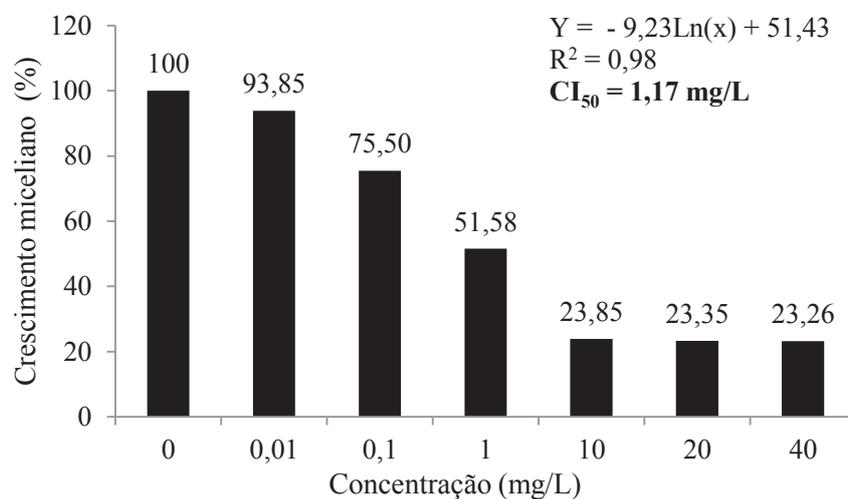


Figura 36. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina.

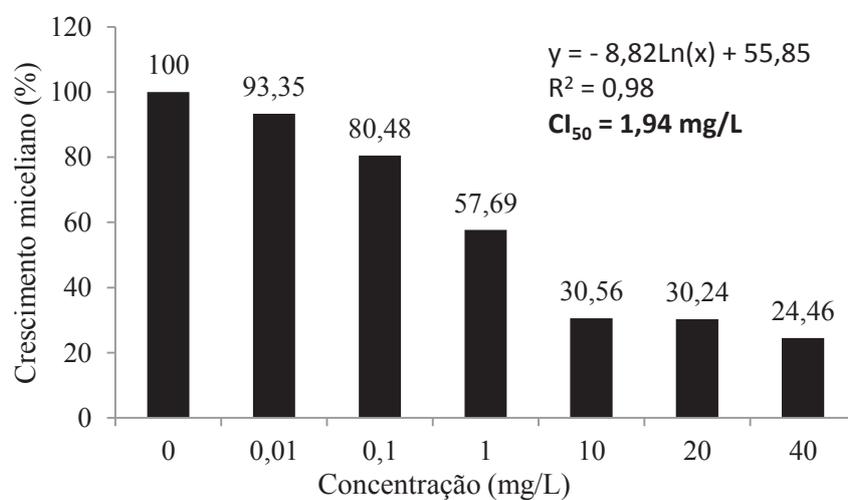


Figura 37. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina.

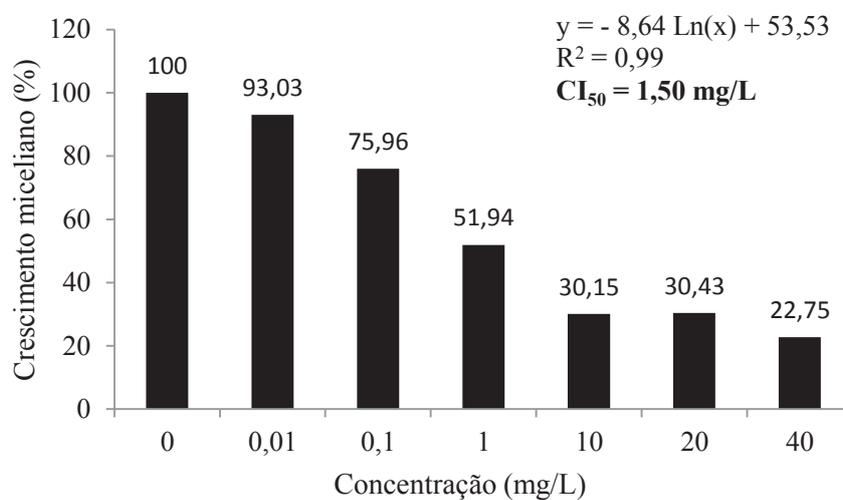


Figura 38. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobin.

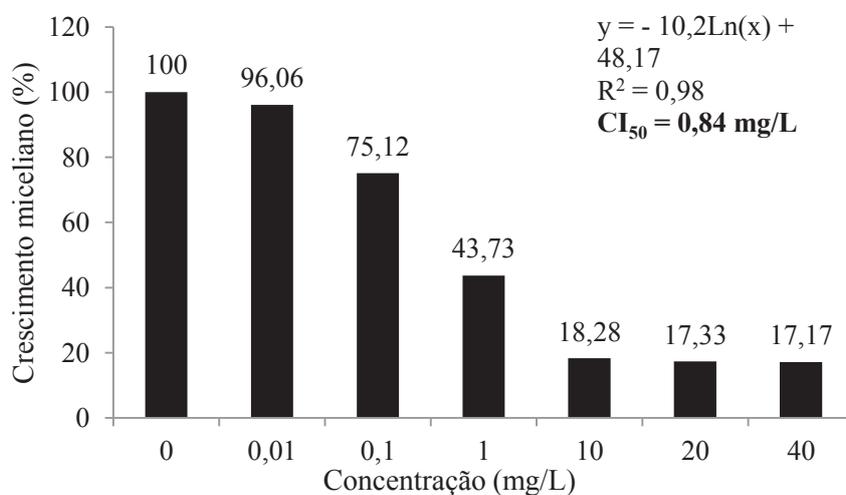


Figura 39. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobin.

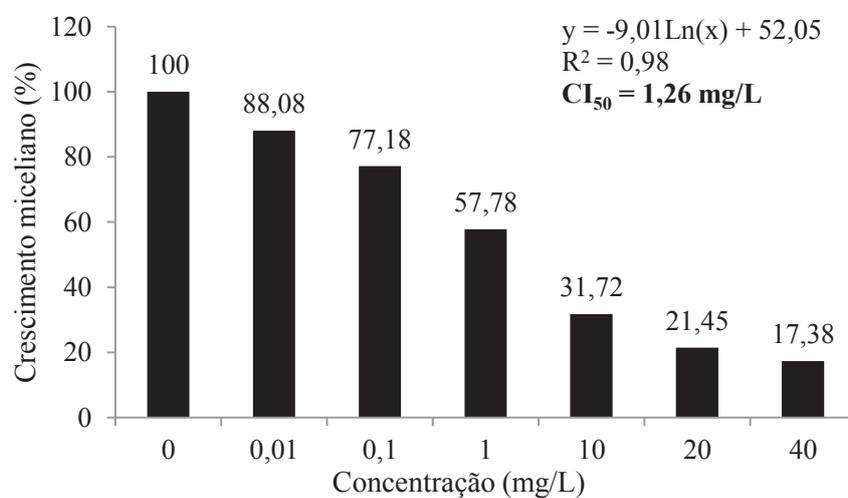


Figura 40. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccas*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobin.

APÊNDICE 19 – Fungicida trifloxistrobina

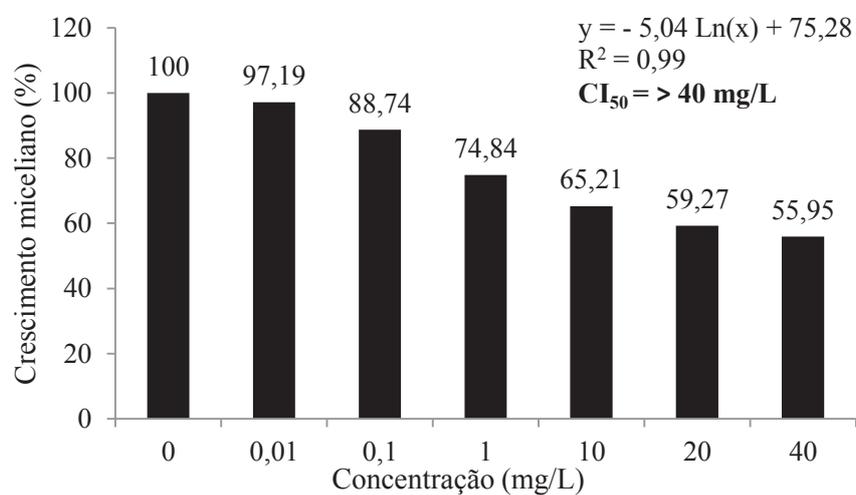


Figura 41. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccas*, para o isolado de trigo 01/F30, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

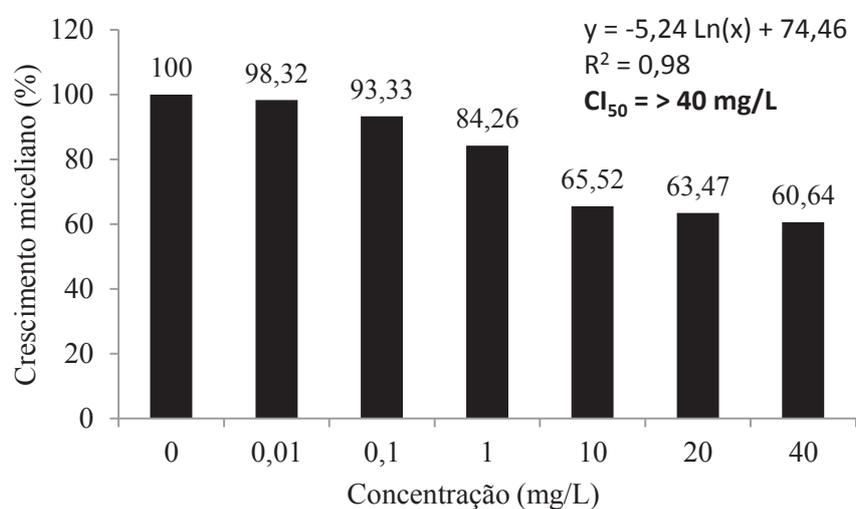


Figura 42. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 02/RZ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

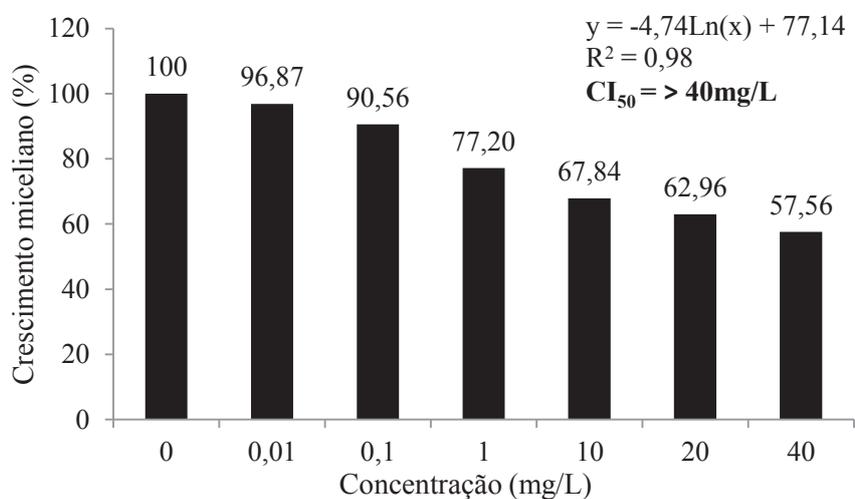


Figura 43. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 03/SF, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

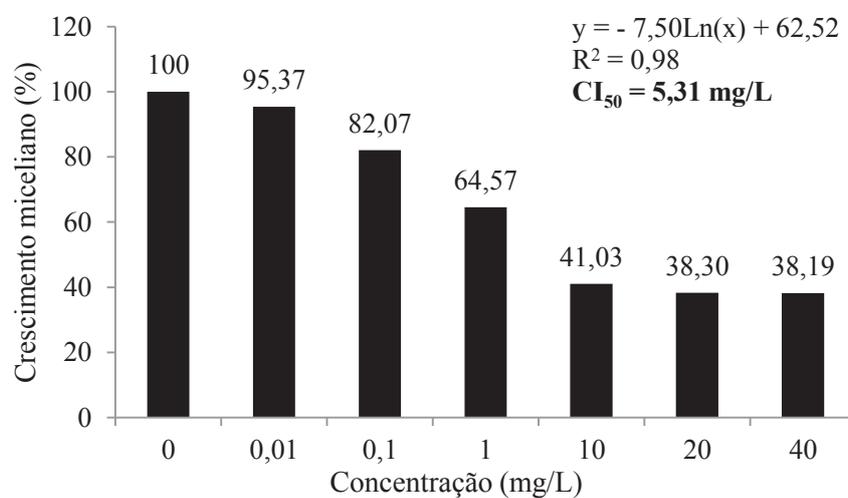


Figura 44. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 04/F52, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.

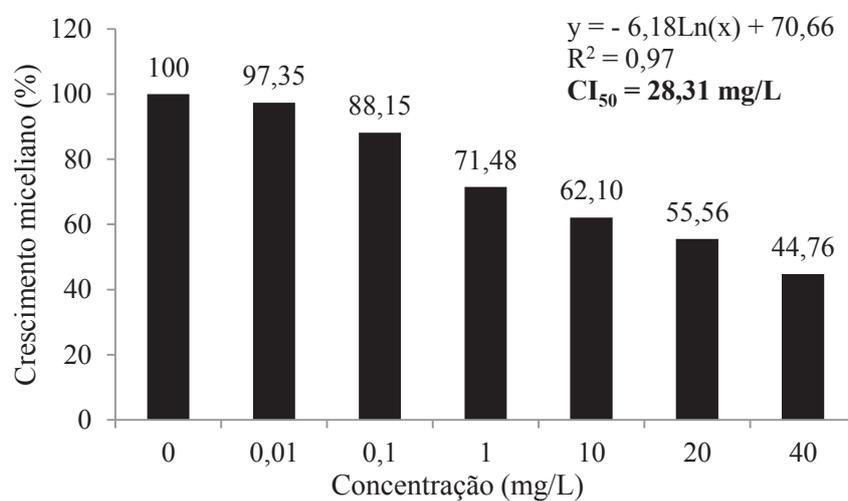


Figura 45. Crescimento miceliano (%) de *Drechslera siccans*, para o isolado de trigo 05/VQ, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida trifloxistrobina.