

Avaliação da sensibilidade de isolados paulistas de *Phytophthora infestans* ao princípio ativo Dimetomorfe pelo método de microtitulação colorimétrica

Samantha Zanotta¹; Eliana Borges Rivas¹; Guilherme Augusto Cabral Silva²; Ricardo Harakava²

Instituto Biológico/Centro de Pesquisa de Sanidade Vegetal/Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP. ¹Laboratório de Diagnóstico Fitopatológico; ²Laboratório de Bioquímica Fitopatológica; Autor para correspondência (samanthazanotta@hotmail.com)

De acordo com o FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), quando um fungicida não é mais utilizado, em uma cultura, devido à resistência do patógeno alvo que afeta a produção eficiente de alimentos. A resistência de fungos a fungicidas pode ser classificada como qualitativa ou quantitativa. Na qualitativa ocorre a perda da efetividade do fungicida, de modo repentino e marcante, devido a presença de populações de patógenos que apresentam suscetibilidade e resistência. Na quantitativa ocorre a diminuição gradual da eficácia no controle da doença, assim como a diminuição da suscetibilidade das populações do patógeno.

Para o monitoramento da resistência de fungos a fungicidas é de extrema importância que se analise um grande número de isolados e se utilizem técnicas de monitoramento que requerem um alto investimento e tempo (RAPOSO et al. 2015).

Um dos métodos mais utilizados para medir a sensibilidade de uma população de patógenos a fungicidas e determinar a concentração efetiva para reduzir metade do crescimento da colônia do fungo (EC_{50}), é o método de inibição do crescimento micelial da colônia em meio de cultura (ICM) (DEKKER, 1987). Como alternativa, a sensibilidade de fungos a fungicidas pode ser avaliada através da metodologia de microtitulação colorimétrica. Esse método é recomendado pelo FRAC, já sendo empregada em diversos estudos de monitoramento de resistência (VALÊNCIO, 2017).

O método de microtitulação consiste em cultivar o fungo, em meio líquido, em poços de microplacas de poliestireno e avaliar seu crescimento sob diferentes diluições de princípios ativos por espectrofotometria (LUDWING; BOLLER, 1990).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados paulistas do oomiceto *Phytophthora infestans*, ao princípio ativo Dimetomorfe, pelo microtitulação colorimétrica.

Para a realização dos experimentos foram selecionados três isolados de *P. infestans*, obtidos previamente de *Solanum tuberosum* cultivada comercialmente nos municípios paulistas de Vargem Grande do Sul, Itapetininga e Leme. Para a obtenção do inóculo, os esporângios foram coletados adicionando 10 mL de meio líquido de ervilha, em cada placa de Petri contendo o isolado crescido em meio V8, e feito uma raspagem do micélio com lâmina descartável estéril. A suspensão de esporângios foi filtrada em gaze esterilizada e a concentração foi ajustada para 10^4 esporos mL^{-1} com o auxílio de câmara de Neubauer.

O princípio ativo Dimetomorfe (concentração 50,00% m/v) foi utilizado nas concentrações de 0; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 $\mu g.mL^{-1}$, diluídas a partir de solução estoque dos fungicidas na concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$.

Para avaliar a sensibilidade dos isolados ao princípio ativo, 50 µL da suspensão de esporângios na concentração 10^4 foram aplicados em poços de placas de poliestireno estéreis, e a seguir foram adicionados 50 µL das diferentes concentrações do fungicida. As diluições dos fungicidas foram distribuídas na placa em valores crescentes nas linhas e os isolados em triplicata por coluna. Em todas as microplacas continham controles negativos (50 µL do meio de cultura de ervilha + 50 µL de água osmose reversa autoclavada) e positivos (50 µL da suspensão de esporângios + 50 µL de água osmose reversa autoclavada). Os experimentos foram repetidos duas vezes.

As placas de poliestireno foram tampadas e envoltas com parafilme, para evitar a evaporação, e colocadas em mesa agitadora por 15 minutos, para homogeneizar a mistura do produto com a suspensão de esporângios. A seguir, foram mantidas em câmara de crescimento a 16°C no escuro por cinco dias. Após esse período, a leitura da absorbância foi realizada a 405 nm em um leitor de microplacas Multiskan (Thermo Fisher Scientific). As médias obtidas dos valores de absorbância para as triplicatas de cada isolado, em cada diluição do fungicida, e dos controles positivo foram subtraídas da média da absorbância das triplicatas dos controles negativo, nas respectivas diluições.

Os dados obtidos da microtitulação colorimétrica foram analisados estatisticamente pela análise da variância e comparados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os valores de EC50 (concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento do patógeno) foram calculados a partir das médias das absorbâncias obtidas nas diferentes concentrações dos princípios ativos. Plotou-se a porcentagem de redução no eixo Y e a concentração dos fungicidas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) no eixo X, este em escala logarítmica. A equação logarítmica de ajuste dos dados foi calculada, bem como o valor de R^2 para cada isolado em cada fungicida testado. A equação das retas utilizada foi $Y = -a*\ln(x) + b$, onde: a e b = parâmetros da equação, X= concentração do fungicida ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e Y = porcentagem de redução do crescimento do patógeno. O valor de Y foi substituído por 50, em cada equação, obtendo-se a concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento do patógeno.

Os três isolados de *P. infestans* apresentaram sensibilidade ao princípio ativo dimetomorfe (Tabela 1). Como pode ser observado nessa tabela todos os isolados apresentaram menor absorbância na concentração a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Convém salientar que, este método quantifica a massa fúngica presente no poço da microplaca e quanto menor a absorbância, menor é o desenvolvimento do fungo frente a concentração do fungicida naquele poço. Estatisticamente, entretanto, os isolados de Vargem Grande do Sul e de Itapetininga apresentaram comportamentos similares frente ao princípio ativo, a partir da concentração na concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já o isolado de Leme apresentou comportamento similar a partir da concentração $3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os EC50 determinados para cada isolado foram: $0,012593 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Vargem Grande do Sul); $0,168819 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Itapetininga) e $0,009677 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes valores podem indicar que o isolado de Leme é mais suscetível ao Dimetomorfe que os demais isolados, mas de qualquer modo estes valores obtidos são mais baixos do que aqueles encontrados na literatura nacional ($0,03$ a $1,46 \mu\text{g mL}^{-1}$) para esse sistema *P. infestans* x Dimetomorfe (OLIVEIRA 2010). Isto pode indicar que os isolados de *P. infestans* podem estar se tornando mais sensíveis ao Dimetamorfe.

Uma aplicação prática do método de microtitulação colorimétrica é fornecer a informação estratégica para o produtor se os isolados de fungos presentes na cultura são sensíveis aos fungicidas que está empregando para o controle do fungo alvo. Além disso, está

é uma técnica que fornece um resultado rápido e a baixo custo para ser utilizado como ferramenta para manejo de doenças fúngicas.

Tabela 1. Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de dimetomorfe para isolados de *Phytophthora infestans* e EC₅₀ obtido por isolado.

Concentração [µg mL ⁻¹]	Vargem Grande do Sul	Itapetininga	Leme
0	0,1861 a	0,0911 a	0,2127 a
0,01	0,1589 a	0,0847 ab	<u>0,1331 b</u>
0,03	<u>0,1118 b</u>	0,0727 abc	0,0956 c
0,1	0,1031 bc	0,0557 bcd	0,0786 cd
0,3	0,0853 bc	<u>0,0485 cd</u>	0,0641 cde
1	0,0796 bc	<u>0,0418 cd</u>	0,0593 de
3	0,0717 bc	0,0353 d	0,0551 de
10	0,0586 c	0,0286 d	0,0403 e
CV%	15,07	20,79	13,4
EC ₅₀	0,012593	0,168819	0,009677

CV% = Coeficiente de variação em %; EC₅₀ = Concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento micelial do patógeno.

Referências bibliográficas

- DEKKER, J. How to detect and measure fungicide resistance. **In:** Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology, 1987. 299 p.
- LUDWIG, A. BOLLER, T. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, n. 1-2, p. 61–66, 1990.
- Fungicide Resistance Action Committee - FRAC, Disponível em: <http://www.frac.info>. Acesso em: 20 abril 2020.
- OLIVEIRA, S. A. S. **Genetic structure, aggressiveness and fungicide sensitivity of *Phytophthora infestans* populations from the south and southeast regions of Brazil.** 2010. 96f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- RAPOSO, R. et al. Application of an Automated Quantitative Method to Determine Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, v. 79, n. 03, p. 294-296, 2015.
- VALENCIO, S. A. X. **Microtitulação colorimétrica para avaliar a sensibilidade de *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* spp. a fungicidas e caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp.** 2017. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.