



Todo o conteúdo deste periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons.

All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution License](#).

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0100-41582006000500007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

Resistência de *Didymella bryoniae* a Fungicidas no Brasil

Gil R. Santos¹, Adalberto C. Café-Filho¹ & Ailton Reis²

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF;

²Embrapa Hortaliças, Cx. Postal 218, CEP 70359-970, Brasília, DF

(Aceito para publicação em 20/11/2006)

Autor para correspondência: Gil R. Santos

SANTOS, G.R., CAFÉ-FILHO, A.C. & REIS, A. Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. Fitopatologia Brasileira 31:476-482. 2006.

RESUMO

O crestamento gomoso do caule (*Didymella bryoniae*) é uma das mais importantes doenças da melancia (*Citrullus lanatus*) no mundo. O controle químico, embora amplamente adotado, nem sempre pode impedir o progresso da doença no campo. A resistência do agente causal a alguns ingredientes ativos foi relatada na Europa, Japão e nos Estados Unidos, porém nenhum estudo foi feito no Brasil. Este trabalho descreve os resultados de três ensaios *in vitro* para resistência a fungicidas, medida pela taxa de crescimento micelial. No primeiro ensaio, sete isolados foram submetidos a nove fungicidas na metade da dose comercial recomendada. Evidência de resistência a Tiofanato metílico (TM), Carbendazim (CARB) (benzimidazóis) bem como a mistura Tiofanato metílico + Clorotalonil (TM + CHLO) foi detectada. Nenhuma resistência foi detectada contra Mancozebe, Difenconazole, Tebuconazole e as misturas Mancozebe + Difenconazole ou Trifloxistrobina + Propiconazole. O teste foi repetido com os mesmos sete isolados de *D. bryoniae* contra TM, CARB, TM + CHLO e Oxicloreto de Cobre a ¼, ½, 1 e 2 vezes a dose recomendada. Apenas Oxicloreto de cobre diminuiu consistentemente a taxa de crescimento micelial com o aumento da dose. TM não teve efeito na taxa de crescimento micelial em nenhuma concentração testada, e CARB e TM + CHLO mostraram mínimo efeito com o aumento da concentração do produto. Finalmente, 31 isolados de sete estados brasileiros foram testados para resistência a Tiofanato metílico na dose recomendada (490 ppm). Oitenta e um por cento dos isolados mostraram-se altamente resistentes. Isolados resistentes e sensíveis foram encontrados em uma mesma região geográfica. Considerando a prevalência de isolados resistentes a ambos TM e CARB, uma evidência de resistência cruzada, o uso de benzimidazóis não deve ser recomendado no controle do crestamento gomoso do caule.

Palavras-chave adicionais: benzimidazóis, sensibilidade a fungicidas, *Ascochyta cucumis*.

ABSTRACT

Didymella bryoniae resistance to fungicides in Brazil

Gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) is one of the most important diseases of watermelon (*Citrullus lanatus*) worldwide. Chemical control, although widely adopted, cannot always avoid disease progress in the field. Resistance of the causal agent to some active ingredients has been reported in Europe, Japan and in the United States, but no such study has been done in Brazil. This work reports results of three *in vitro* assays for fungicide resistance, as measured by the rate of mycelial growth. In the first test, seven isolates were evaluated against nine fungicides at half the recommended commercial doses. Evidence of resistance to Methyl Thiophanate (TM) and Carbendazim (CARB) (Benzimidazoles) as well as to the mixture of Methyl-Thiophanate and Chlorotalonil (TM+CHLO) was detected. No resistance was suggested to Mancozeb, Difenconazole, Tebuconazole and the mixtures Mancozeb + Difenconazole or Trifloxistrobine + Propiconazole. The test was repeated with the same seven isolates of *D. bryoniae* against TM, CARB, TM+CHLO and Copper Oxichlorate at ¼, ½, 1 and 2 times the recommended doses. Only Copper Oxichlorate consistently caused a decrease in the mycelial growth rates with increasing doses. TM had no effect on the mycelial growth rates at any of the concentrations tested, and CARB and TM+CHLO showed very minor effects with increasing product concentrations. Finally, a collection of 31 isolates from seven Brazilian states was tested for resistance against TM at the recommended dose (490 ppm). Eighty-one per cent of the isolates, from most Brazilian states, proved to be highly resistant. Resistant and sensitive isolates were found in the same geographic regions. Considering the prevalence of isolates resistant to both TM and CARB, an evidence of cross-resistance, the use of benzimidazoles should be avoided for gummy stem blight control.

Additional keywords: benzimidazoles, sensitivity to fungicides, *Ascochyta cucumis*.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças da cultura da melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] o crestamento gomoso do caule

é uma das principais (Santos *et al.* 2005a, b). Os sintomas incluem cancro no caule, queima das folhas e também apodrecimento de frutos (Schenk, 1968). A doença vem despertando preocupação em todo Brasil, incluindo os perímetros irrigados do nordeste (Dias *et al.*, 1996), e em outros países como nos Estados Unidos (Everts, 1999; Keinath & Duthie, 1998; Schenk, 1960; Sitterly & Keinath, 1996) e no Caribe tropical (Bala & Hosein, 1986). O agente causal é o fungo *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm [sin.

*Parte da tese de doutorado em Fitopatologia do primeiro autor apresentada à Universidade de Brasília (2005). Endereço atual do primeiro autor: Departamento de Agronomia, Campus Universitário de Gurupi, Universidade Federal de Tocantins/Agronomia, Cx. Postal 66, CEP 77400-000, Gurupi, TO, e-mail: gilrsan@uft.edu.br

Mycosphaerella citrullina (C.O. Sm.) Grossenbach], com o anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey & Roum. [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.: Fr.) Sacc.] que tem como hospedeiras diversas espécies de *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita* da família Cucurbitaceae (Keinath, 1995).

Em condições de cultivo comercial em campo no Estado do Tocantins, Santos *et al.* (2005a) encontraram perdas de 10,3 t/ha na testemunha (plantas não tratadas com fungicidas), correspondendo a 19% de redução na produção e 26,5% da área foliar afetada. No que se refere à resistência genética, Santos e Café Filho (2005), demonstraram recentemente significativas diferenças de susceptibilidade entre cultivares comerciais de melancia. Entretanto, altos níveis de resistência em genótipos comerciais de cucurbitáceas não estão disponíveis (Dias *et al.* 1996; Mcgrath *et al.*, 1993; Sumner & Hall, 1993; Wehner & Amand, 1993).

O controle da doença com fungicidas, embora amplamente adotado (Keinath, 1995), é com frequência pouco eficiente, o que tem sido atribuído à rápida infecção das folhas por *D. bryoniae* (Army & Rowe, 1991; Van Steekelemburg, 1985) ou à resistência aos benzimidazóis na população do patógeno quando este ingrediente ativo é utilizado (Malathrakis & Vakalounakis, 1983). Entre os benzimidazóis, o Tiofanato metílico vem sendo amplamente utilizado nos Estados do Tocantins, Goiás e no Distrito Federal há mais de 15 anos no controle de doenças em várias culturas, incluindo a melancia e o melão. Patógenos resistentes a fungicidas além dos danos causados nas culturas devido à ineficiência do controle também encarecem o custo de produção, porque muitas vezes o produtor tende a aumentar o número de aplicações ou a dose recomendada na esperança de conseguir um melhor controle.

No Brasil não há relatos de resistência deste patógeno a fungicidas, porém é freqüente a observação em campo de ineficiência de controle do crestamento gomoso do caule

na cultura da melancia. Este trabalho teve por principal objetivo avaliar a existência de resistência de *D. bryoniae* a fungicidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Resistência a fungicidas - Ensaio I

Para seleção inicial dos fungicidas a serem testados para resistência, foram utilizados isolados obtidos em 2003, em módulos do Projeto Formoso, nos municípios de Formoso do Araguaia, e da Lagoa da Confusão, TO. Para isolamento de *D. bryoniae*, foram coletadas amostras de caules de melancia com sintomas de crestamento gomoso. Fragmentos de caules afetados foram desinfestados superficialmente com álcool etílico 50% e hipoclorito de sódio a 1%. Em seguida, foram transferidos para meio de BDA (250 g de batata + 15 g de dextrose + 20 g de agar-ágar + 715 mL de água), onde ficaram incubados por uma semana sob fotoperíodo de 12h e temperatura de $29^{\circ} \pm 4^{\circ} \text{C}$. Foram avaliados um total de sete isolados (Tabela 1) e oito fungicidas, selecionados entre aqueles utilizados pelos produtores da região. Os fungicidas foram utilizados nas doses de ingrediente-ativo correspondentes a 50% da concentração recomendada para aplicação no campo na cultura da melancia ou em outras culturas. Os seguintes princípios ativos e dosagens dos fungicidas foram utilizados (p.c.: produto comercial):

- Tiofanato metílico: 24,5 g (Cercobin: 35g p.c./100 l),
- Carbendazim: 250 ml (Derosal: 500 ml p.c./ha),
- Tiofanato metílico: 20 g + Clorotalonil: 50 g (Cerconil: 100g p.c.100 l),
- Mancozebe: 80,1 ml (Persist: 180 ml p.c./100 l de água),
- Difenoconazole: 37,5 ml (Score: 150 ml p.c./ha),
- Mancozebe: 40 ml + Difenoconazole: 18,6 ml (Persist: 90 ml p.c./100 l + Score: 75 ml p.c./ha).

TABELA 1 - Código, procedência e hospedeiro de origem dos isolados de *Didymella bryoniae* utilizados nos ensaios

| Código do Isolado | Procedência | Hospedeiro | Ensaio |
|------------------------------------|-----------------------|------------|------------|
| Fo-1, Fo-3, Fo-4, Fo-5, Fo-7, | Formoso, TO | Melancia | I, II, III |
| Fo-2, Fo-6 | Formoso, TO | Melancia | III |
| Le-a, Le-c | Lenine, TO | Melancia | I, II, III |
| Le-b | Lenine, TO | Melancia | III |
| Lagoa a, Lagoa b, Lagoa c | Lagoa da Confusão, TO | Melancia | III |
| Melancia Gu | Gurupi, TO | Melancia | III |
| 73, 74, 79 | Uruana, GO | Melancia | III |
| 77 | Marasol, MT | Melancia | III |
| I 584 | Carandaí, MG | Melancia | III |
| 75 | Petrolina, PE | Melancia | III |
| I 570 | Lambari, SP | Melancia | III |
| I 629 | Igarapé, MG | Melancia | III |
| Melancia Brasília b, Brasília -c | Brasília, DF | Melancia | III |
| Melancia Fa | Fausto, DF | Melancia | III |
| 76 | Vagem Bonita, DF | Melão | III |
| 78, Melão Brasília -c, Brasília -a | Brasília, DF | Melão | III |
| 80 | Petrolina, PE | Melão | III |
| 81 | Brasília, DF | Abóbora | III |

- Trifloxistrobina: 43,75g + Propiconazole:43,75g (Stratego: 350 ml p.c./ha),
- Tebuconazole:10g (Folicur: 50g p.c./100 l), e
- Testemunha (sem fungicida).

Para os fungicidas recomendados em dosagens/ha, considerou-se um volume total de aplicação de 300 litros de água/ha. Os fungicidas foram misturados ao meio BDA quando este ainda em estado líquido ($\pm 45^{\circ}\text{C}$.) e vertidos em placas de Petri de 9 cm. Em seguida, foram transferidos para o centro das placas discos de BDA com 0,6 cm de diâmetro com micélio de uma cultura de *D. bryoniae* com sete dias de idade. Os discos foram mantidos em incubadora a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. Após cinco dias de incubação, mediu-se o diâmetro do micélio com régua graduada e calculou-se a porcentagem de crescimento tendo como base o crescimento em BDA sem fungicida (considerado crescimento 100%). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com três repetições e dois fatores (fungicidas e isolados) em esquema fatorial de 9×7 .

Sensibilidade de isolados de *D. bryoniae* a concentrações crescentes de fungicidas - Ensaio II

Três fungicidas previamente selecionados dentre aqueles que permitiram maiores índices de crescimento micelial e o Oxiclureto de cobre foram testados nas concentrações correspondentes a 25, 50, 100 e 200% da recomendação comercial (RC) dos seguintes princípios ativos (p.a):

- Tiofanato metílico: 49g, p.a. = 490 ppm (RC, Cercobin 70 g p.c./100 l);
- Carbendazim: 500ml, p.a.=1666,6 ppm (RC, Derosal 1000 ml p.c./ha, em um volume de calda de 300 l água);
- Tiofanato metílico: 40g + Clorotalonil: 100g, p.a. = 400 + 1000 ppm, respectivamente (RC, Cerconil 200g p.c./100 l);
- Oxiclureto de cobre: 168g, p.a. = 1680 ppm (RC,

Cobox 200g p.c./100 l); e

- Testemunha (sem fungicida).

Os mesmos sete isolados de *D. bryoniae* utilizados no primeiro ensaio foram reavaliados (Tabela 1). A metodologia utilizada para mistura dos fungicidas ao meio, repicagem, incubação e avaliação do crescimento foram as mesmas descritas no ensaio anterior. Os resultados foram avaliados por meio de análise de regressão.

Sensibilidade de isolados de *D. bryoniae* ao Tiofanato metílico - Ensaio III

Para avaliar a prevalência da resistência ao Tiofanato metílico nas populações nacionais de *D. bryoniae* 31 isolados de melancia, melão e abóbora procedentes de sete estados de diferentes regiões brasileiras foram testados (Tabela 1). Previamente, ao início dos testes, as colônias que estavam em cultura há muito tempo foram reinoculadas e reisoladas de caules de plantas de melancia (cv. Crimson Sweet) para uniformização do estágio fisiológico dos isolados. O fungicida utilizado neste ensaio foi o Tiofanato metílico na concentração de 490 ppm correspondente a dose da recomendação comercial (Cercobin, 70g p.c./100 l), para o qual os ensaios anteriores revelaram prevalência de resistência ao p.a.

Utilizou-se da mesma metodologia descrita nos ensaios anteriores. Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, com 31 tratamentos e quatro repetições.

RESULTADOS

Resistência a fungicidas

Foram detectadas diferenças significativas tanto entre fungicidas quanto entre isolados (Tabela 2). Na utilização de meia dose da recomendação comercial foi verificado maior crescimento de *D. bryoniae* nos tratamentos com Tiofanato metílico, Carbendazim e Tiofanato metílico +

TABELA 2 - Crescimento micelial de isolados de *Didymella bryoniae* em BDA adicionado de meia dose da recomendação comercial de princípio ativo de fungicidas*

| Fungicidas | Isolados de <i>D. bryoniae</i> | | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|----------|-----------|
| | Fo-1 | Fo-3 | Fo-4 | Fo-5 | Fo-7 | Le-a | Le-b |
| Tiofanato metílico | 97,1ab A | 83,0ab AB | 116,3a A | 86,8ab AB | 82,6ab AB | 103,8a A | 67,5b B |
| Carbendazim | 78,2bc | 41,6cd A | 72,8bc A | 67,8b A | 50,3bcd A | 68,3bc A | 68,0b A |
| Tiof. metílico + Clorotalonil | 57,8cd A | 45,1cd A | 71,0bc A | 66,1b A | 69,0bc A | 56,7c A | 75,6b A |
| Mancozebe | 40,3cde AB | 19,1de BC | 34,4cd AB | 66,0b A | 30,6cde AB | 0,0d C | 52,7bc AB |
| Difenoconazole | 17,9def AB | 5,2e AB | 15,0de AB | 7,4c AB | 21,5def A | 0,0d B | 21,3cd A |
| Mancozebe + Difenoconazole | 10,5ef A | 0,0e A | 0,0e A | 0,0c A | 5,1ef A | 0,0d A | 13,4d A |
| Trifloxistrobina + Propiconazole | 0,0f A | 0,0e A | 0,0e A | 0,0c A | 0,0f A | 0,0d A | 0,0d A |
| Tebuconazole | 0,0f A | 0,0e A | 0,0e A | 0,0c A | 0,0f A | 0,0d A | 0,0d A |
| Testemunha | 100,0a A | 100,0a A | 100,0a A | 100,0a A | 100,0a A | 100,0a A | 100,0a A |
| Coefficiente de variação (%) | 23,6 | | | | | | |

*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

*Dados originais em porcentagem foram transformados para $\arcseno \sqrt{(x + 0,5)}$ para a análise estatística.

*Crescimento relativo em porcentagem do crescimento micelial em BDA sem fungicida.

Clorotalonil. Maior inibição do crescimento foi encontrada com Tebuconazole, Trifloxistrobina + Propiconazole e Mancozebe + Difenconazole. Mancozebe e Difenconazole isoladamente tiveram efeito intermediário. Para Tiofanato metílico houve diferença estatística para o crescimento micelial dos isolados Fo-1, Fo -4, Le-a que diferiram de Le-b. Não houve diferença entre os isolados para os tratamentos com Carbendazim, Tiofanato metílico + Clorotalonil, Mancozebe + Difenconazole, Trifloxistrobina + Propiconazole e Tebuconazole. No tratamento com Difenconazole diferiram os isolados Fo-7 e Le-b de Le-a que teve seu crescimento totalmente inibido. No tratamento com Mancozebe houve diferença entre os isolados Fo-5, Le-a e Fo-3.

Sensibilidade de isolados de *D. bryoniae* a concentrações crescentes de fungicidas

Para o Tiofanato metílico testado a 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 vezes da recomendação comercial, correspondente a 122,5; 245; 490 e 980 ppm, todos os isolados de *D. bryoniae* foram resistentes e não apresentaram redução no crescimento do micélio em nenhuma dose testada (Figura 1A). Houve redução de crescimento para todos os isolados de *D. bryoniae* a 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 vezes da dose comercial de Tiofanato metílico 40 g p.a + Clorotalonil 100 g p.a. (400 + 1000 ppm, respectivamente) (Figura 1B). Também houve redução do

crescimento no diâmetro da colônia para Carbendazim nas concentrações testadas (Figura 1C). Para o Oxicloreto de cobre não houve crescimento de nenhum isolado a partir da RC (168 g p.a/100 l água = 1680 ppm (Figura 1D).

A regressão linear entre o crescimento relativo dos isolados de *D. bryoniae* e doses dos fungicidas mostrou coeficiente de determinação (r^2) alto para a maioria dos isolados dentro dos fungicidas (Tabela 3), exceto para o Tiofanato metílico, cujas equações ajustadas apresentaram coeficientes de inclinação geralmente positivos e coeficientes de correlação não significativos, refletindo a falta de uma linha de tendência bem definida nas diferentes concentrações (Figura 1A). Para os demais fungicidas, as equações ajustadas apresentaram coeficientes de inclinação fracamente negativos, exceto para o Oxicloreto de cobre, com coeficientes cerca de 10 vezes maiores que os demais, refletindo um maior efeito negativo sobre o crescimento micelial com aumento da concentração.

Sensibilidade de isolados de *D. bryoniae* ao Tiofanato metílico

A maior parte dos isolados testados (81%) mostrou resistência ao Tiofanato metílico a uma concentração de 490 ppm, correspondente a recomendação comercial (Tabela 4). Os isolados 80 (Melão Petrolina, PE), 75 (Melancia Petrolina,

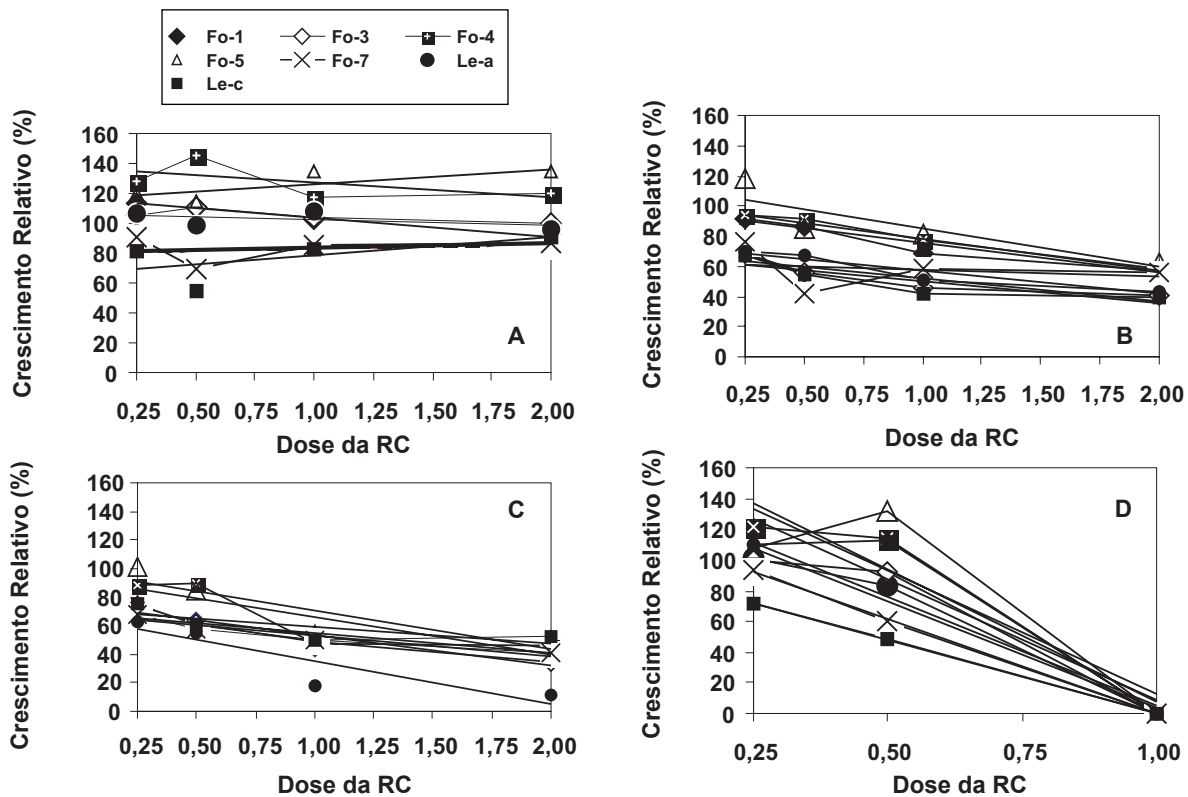


FIG. 1 - Crescimento relativo de sete isolados de *Didymella bryoniae* em quatro doses da recomendação comercial (RC) de Tiofanato metílico 49 g; **A.** p.a.=490 ppm Tiofanato metílico 40g + Clorotalonil 100 g; **B.** p.a.=400 + 1.000 ppm, respectivamente Carbendazim; **C.** (500 mL, p.a.=1.666,6 ppm); Oxicloreto de cobre 168 g; **D.** p.a.=1.680 ppm.

TABELA 3 - Regressão linear entre o crescimento micelial relativo de isolados de *Didymella bryoniae* em meios de cultura com doses crescentes de fungicidas

| Fungicida | Isolados | Equação | r ² |
|-----------------------------------|----------|---------------------|----------------|
| Tiofanato metílico | Fo-1 | Y=0,0265x + 116,59 | 0,99* |
| | Fo-3 | Y=-0,0096x + 109,46 | 0,69 |
| | Fo-4 | Y=-0,019x + 136,37 | 0,32 |
| | Fo-5 | Y=0,0204x + 116,37 | 0,61 |
| | Fo-7 | Y=0,0061x + 80,33 | 0,05 |
| | Le-a | Y=-0,0083x + 106,17 | 0,31 |
| | Le-c | Y=0,0247x + 65,91 | 0,34 |
| Tiofanato metílico + Clorotalonil | Fo-1 | Y=-0,0293x + 69,282 | 0,70 |
| | Fo-3 | Y=0,0434x + 74,777 | 0,94* |
| | Fo-4 | Y=-0,0541x + 92,733 | 0,71 |
| | Fo-5 | Y=-0,0564x + 98,361 | 0,75 |
| | Fo-7 | Y=-0,029x + 67,306 | 0,90* |
| | Le-a | Y=-0,0606x + 64,764 | 0,80* |
| | Le-c | Y=-0,0229x + 70,044 | 0,54 |
| Carbendazim | Fo-1 | Y=-0,0401x + 94,703 | 0,93* |
| | Fo-3 | Y=-0,0297x + 66,526 | 0,79* |
| | Fo-4 | Y=-0,0428x + 99,623 | 0,99* |
| | Fo-5 | Y=-0,0528x + 110,97 | 0,76* |
| | Fo-7 | Y=-0,0093x + 62,174 | 0,06 |
| | Le-a | Y=-0,0321x + 72,971 | 0,89* |
| | Le-c | Y=-0,0289x + 64,224 | 0,75 |
| Oxicloreto de Cobre | Fo-1 | Y=-0,2828x + 142 | 0,97* |
| | Fo-3 | Y=-0,2877x + 146,55 | 0,93* |
| | Fo-4 | Y=-0,3513x + 179,22 | 0,92* |
| | Fo-5 | Y=-0,3278x + 173,47 | 0,76 |
| | Fo-7 | Y=-0,2535x + 123,68 | 0,99* |
| | Le-a | Y=-0,3209x + 165,69 | 0,87 |
| | Le-c | Y=-0,1958x + 96,013 | 1,00* |

*Coeficiente de correlação (r) significativos a 0,05 e 3 graus de liberdade (Cobre), ou 4 g.L (demais produtos).

PE), 78 (Melão Brasília, DF), 73 (Melancia Uruana, GO), 77 (Melancia Marasol, MT) e 76 (Melão Vagem Bonita, DF) foram sensíveis ao Tiofanato metílico e tiveram seu crescimento totalmente inibido. Os isolados Fo-7 (Melancia Formoso, TO) e Fo-5 (Melancia Formoso, TO) tiveram seu crescimento parcialmente inibido na presença de Tiofanato Metílico a 490 ppm (78,1 e 71%, respectivamente). Os isolados 74 (Melancia Uruana, GO) e Fo-2 (Melancia Formoso, TO) foram os que apresentaram maior resistência, crescendo a taxas superiores às da testemunha.

DISCUSSÃO

Dentre todos os produtos testados verificou-se maior resistência de *D. bryoniae* aos fungicidas do grupo químico benzimidazol utilizados isoladamente (Tiof. Metílico, Carbendazim) ou em misturas com outros fungicidas (Tiof. Metílico + Clorotalonil). *D. bryoniae* apresentou sensibilidade a outros grupos de fungicidas, tais como os Triazóis (Tebuconazole, Difenconazole), Estrobilurinas em mistura com Triazóis (Trifloxistrobina + Propiconazole) e ao grupo Ditiocarbamato em mistura com Triazóis, ou

utilizado isoladamente (Mancozebe + Difenconazole, Mancozebe, respectivamente). O Oxicloreto de Cobre inibiu completamente o crescimento dos isolados de *D. bryoniae*, na RC (1.680 ppm, Figura 1D) ou a 3.360 ppm (2x RC, dados não representados), demonstrando a alta sensibilidade do patógeno ao ingrediente ativo.

A literatura registra numerosos casos de resistência aos benzimidazóis entre os patógenos de plantas, como, por exemplo, *Colletotrichum* spp. (Pedroso & Café Filho, 2005), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton (Murray, 1996), *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebr. (Bonnem, 1994), *Sphaerotheca fuliginea* (Schltldl.) Polacci (Mcgrath *et al.* 1996), *Botrytis cinerea* Pers. (Van Steekelenburg, 1987). Os benzimidazóis inibem a síntese da beta-tubulina e conseqüentemente não há formação dos microtúbulos, o que interrompe a migração dos cromossomos durante a mitose e meiose. Assim, não ocorrem as divisões celular e nuclear essenciais ao crescimento micelial e produção de esporos (Hassal, 1990). Este modo de ação pode ser considerado muito específico e, portanto, fácil de

TABELA 4 - Crescimento micelial relativo de isolados de *Didymella bryoniae* em meio BDA adicionado de Tiofanato metílico* na concentração de 490 ppm

| Isolados | Crescimento relativo (%) |
|------------------------------|--------------------------|
| 74 (Melancia Uruana-GO) | 110,0 a |
| Fo 2-Melancia Formoso 2-TO | 109,0 a |
| Melancia Lagoa b-TO | 102,8 ab |
| Fo 3-Melancia Formoso 3-TO | 101,7 ab |
| 79 (Melancia Uruana-GO) | 101,6 ab |
| Melancia Brasília c-DF | 101,0 ab |
| I 584 (Melancia Carandaí-MG) | 100,0 ab |
| Melão Brasília a-DF | 99,0 ab |
| Fo 6-Melancia Formoso 6-TO | 97,7 abc |
| Le a-Melancia Lenine a-TO | 97,1 abc |
| I 570 (Melancia Lambari-SP) | 96,3 abcd |
| I 629 (Melancia Igarapé-MG) | 95,8 abcd |
| Melancia Lagoa a-TO | 94,3 abcd |
| Fo 1-Melancia Formoso 1-TO | 94,1 abcd |
| Melão Brasília c-DF | 94,0 abcd |
| Le b-Melancia Lenine b-TO | 93,9 abcd |
| Melancia Brasília b-TO | 92,4 abcd |
| Melancia Lagoa c-TO | 89,6 bcd |
| 81 (Abóbora-DF) | 89,4 bcde |
| Melancia Fausto-DF | 88,2 bcde |
| Melancia Gurupi-TO | 87,6 bcde |
| Fo 4-Melancia Formoso 4-TO | 87,4 bcde |
| Le c-Melancia Lenine c-TO | 80,3 cde |
| Fo 7-Melancia Formoso 7-TO | 78,1 de |
| Fo 5-Melancia Formoso 5-TO | 71,0 e |
| 80 (Melão Petrolina-PE) | 0,0 f |
| 75 (Melancia Petrolina-PE) | 0,0 f |
| 78 (Melão Brasília-DF) | 0,0 f |
| 73 (Melancia Uruana-GO) | 0,0 f |
| 77 (Melancia Marasol-MT) | 0,0 f |
| 76 (Melão Vagem Bonita-DF) | 0,0 f |
| Coeficiente de Variação (%) | 8,7 |

*Correspondente a dose comercial de 70 g Cercobim/100 L de água.

ser superado pelo patógeno. O mecanismo de resistência aos benzimidazóis é descrito como devido uma alteração do sítio de ação, na β -tubulina (Brent, 1995). Resultados semelhantes aos aqui apresentados foram encontrados com *A. cucumis* em outros estudos envolvendo benzimidazóis, tais como Benomyl e Tiofanato metílico. Keinath & Zitter (1998), trabalhando com isolados oriundos de cucurbitáceas coletados na Carolina do Sul e Nova York, EUA, verificaram que dos 196 isolados da fase anamórfica de *D. bryoniae* testados em meio com 100 mg/l de Tiofanato metílico, 95 foram sensíveis e 101 foram resistentes. Na Grécia, Malathrakakis & Vakalounakis (1983) relataram que isolados de *D. bryoniae* resistentes a benomyl e tratados com 300 mg/l de Tiofanato metílico foram capazes de causar crestamento gomoso do caule em cucurbitáceas. Na Holanda, Van Steekelenburg (1987), verificou que 17% dos isolados de *D. bryoniae* de pepino (*Cucumis sativus* L.) foram resistentes aos benzimidazóis. No Japão, também há registro de resistência de *D. bryoniae* aos benzimidazóis (Kato *et al.* 1984).

Analisando-se a variação na sensibilidade dos isolados a cada fungicida, de modo geral esta pode ser considerada baixa, exceto para o Difenconazole e o Mancozebe, onde foi detectada evidência de sensibilidade diferencial entre os isolados (Tabela 2). Provavelmente, já pode haver isolados com certo nível de resistência dentro da população de *D. bryoniae* presente na região de Formoso a esses fungicidas, o que sugere a necessidade de novos estudos.

Para os quatro fungicidas testados em doses crescentes todos os isolados de *D. bryoniae* coletados na região de Formoso do Araguaia, TO mostraram alta resistência ao Tiofanato metílico utilizado isoladamente e média resistência ao Tiof. Metílico + Clorotalonil e ao Carbendazim. Nos casos dos p.a. Tiofanato metílico e Carbendazim, pode-se inferir que provavelmente houve resistência cruzada (resistência a dois ou mais fungicidas com mecanismo de ação semelhante). Este fato já foi relatado por Keinath & Zitter (1998), quando observaram que 100% dos isolados de *D. bryoniae* resistentes a Benomil, também o foram para o Tiofanato metílico.

Todos os isolados do ensaio II foram inibidos por Oxidloreto de Cobre na concentração igual a RC. Na região do Formoso do Araguaia os produtores vêm utilizando estes fungicidas nas lavouras de melancia há mais de dez anos, tempo suficiente para seleção de populações resistentes a partir de populações predominantemente sensíveis. Entre outras hipóteses para o aparecimento da resistência aos benzimidazóis no Tocantins pode-se considerar: (i) introdução pelas sementes de melancia de isolados resistentes, já que as sementes utilizadas na região são importadas dos EUA, onde o problema já foi detectado há dez anos, (ii) a existência de isolados de *D. bryoniae* resistentes e presentes em outras culturas como melão (*Cucumis melo* L.) plantado na região antes do fomento da cultura da melancia. Essa hipótese pode também ser verdadeira, já que Dovas *et al.* (1976),

observaram que genes de resistência aos benzimidazóis podem ser estáveis na ausência do hospedeiro. Ruppel *et al.* (1980) também relataram que, embora o grau de resistência possa diminuir no patógeno, a frequência de resistência não diminui. Entretanto, a hipótese mais forte seria o desenvolvimento da resistência na própria região, tendo em vista a pressão de seleção contra os benzimidazóis continuada por longo período de tempo no Projeto Formoso, TO

Verificou-se que 81% dos isolados obtidos no Brasil mostraram resistência ao Tiofanato metílico a uma concentração de 490 ppm (Tabela 4). Todos os quinze isolados do Tocantins mostraram alta resistência. Dentre os sete isolados do DF cinco foram resistentes e dois foram sensíveis. Dos isolados de GO dois foram resistentes e um foi sensível. Os dois isolados de MG e um de SP foram resistentes ao Tiofanato metílico. Por outro lado, os isolados de PE e do MT foram sensíveis. Desta forma, observa-se que se pode encontrar isolados resistentes ao Tiofanato metílico na maioria dos estados brasileiros onde se planta a melancia e outras cucurbitáceas. Outros autores também encontraram alta frequência de isolados resistentes em outros países. Na Grécia, trabalhos desenvolvidos por Malathrakakis & Vakalounakis (1983), mostraram que 74,5% dos isolados avaliados foram resistentes aos benzimidazóis. Keinath & Zitter (1998) também encontraram variação geográfica na frequência dos isolados resistentes e sensíveis a benzimidazóis quando avaliaram isolados coletados na Carolina do Sul, Nova York e Flórida. Os resultados verificados no presente trabalho são concordantes com aqueles obtidos por Santos *et al.* (2005b), quando em dois ensaios de campo, em área comercial de melancia, verificaram que o tratamento com Tiofanato metílico isoladamente apresentou alto nível de doença nas folhas e não diferiu da testemunha. Dessa forma, acredita-se que a ineficácia verificada em campo pode revelar a ocorrência da resistência a determinados grupos de fungicidas com modo de ação mais específico.

Também ficou evidenciado neste trabalho que pode haver isolados sensíveis e resistentes ao Tiofanato metílico dentro de uma mesma região. Considerando-se que a alta resistência de *D. bryoniae* aos benzimidazóis, principalmente ao Tiofanato metílico, já existe em vários estados brasileiros onde se cultiva a melancia, é importante que o produtor utilize em aplicações preventivas outros produtos de contato também registrados para a cultura, como é o caso do Mancozebe, Clorotalonil e Oxidloreto de Cobre. Estes fungicidas apresentam maior número de sítios de ação celular e metabólica e, portanto, são mais seguros contra o surgimento de isolados resistentes.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Proc. No. 474194/2003-5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNY, C.J., & ROWE, R.C. Effects of temperature and duration of surface wetness on spore production and infection of cucumbers by *Didymella bryoniae*. *Phytopathology* 81:206-209. 1991.
- BALA, G. & HOSEIN, F. Studies on gummy stem blight disease of cucurbits in Trinidad. *Tropical Agriculture* 63:195-197. 1986.
- BONNEM, A.M. Fungicide resistance in *Verticillium fungicola*, a mycopathogen of *Agaricus bisporus*. *Phytopathology* 84:1138. 1994. (Abstract)
- BRENT, K.J. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? *Brussels: FRAC Monograph 1., 1995.*
- DIAS, R.C.S., QUEIROZ, M.A. & MENEZES, M. Identificação de fontes de resistência em melancia a *Didymella bryoniae*. *Horticultura Brasileira* 14:15-17. 1996.
- DOVAS, C., SKYLAKAKIS, G. & GEORGOPOULOS, S.G. The adaptability of the benomyl-resistant population of *Cercospora beticola* in northern Greece. *Phytopathology* 66:1452-1456. 1976.
- EVERTS, K.L. First report of benomyl resistance of *Didymella bryoniae* in Delaware and Maryland. *Plant Disease* 83:304. 1999.
- HASSAL, K.A. The biochemistry and uses of pesticides: structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. London. Mac Millan Press. 1990.
- KATO, T., SUZUKI, K., TAKAHASHI, J. & KAMOSHITA, K. Negatively correlated cross-resistance between benzimidazole fungicides and methyl N-(3-5-dichlorophenyl) carbamate. *Journal Pesticide Science* 9:489-495. 1984.
- KEINATH, A.P. & DUTHIE, I.A. Yield and quality reductions in watermelon due to anthracnose, gummy stem blight and black rot. *Recent Research Developments in Plant Pathology*, vol. 2, Research Signpost, Trivandrum, India, 1998. pp.77-90.
- KEINATH, A.P. Fungicide timing for optimum management of gummy stem blight epidemics on watermelon. *Plant Disease* 79:354-358. 1995.
- KEINATH, A.P. & ZITTER, T.A. Resistance to Benomyl and Thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. *Plant Disease* 82:479-84. 1998.
- MALATHRAKIS, N.E. & VAKALOUNAKIS, D.J. Resistance to benzimidazole fungicides in the gummy stem blight pathogen *Didymella bryoniae* on cucurbits. *Plant Pathology* 32:395-399. 1983.
- MCGRATH, D.J., VAWDREY, L. & WALKER, I.O. Resistance to gummy stem blight in muskmelon. *HortScience* 28:930-931. 1993.
- MCGRATH, M.T., STANISZEWSKA, H., SHISHKOFF, N. & CASELLA, G. Fungicide sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* populations in the United States. *Plant Disease* 80:697-703. 1996.
- MURRAY, T.D. Resistance to benzimidazole fungicides in the cereal eyespot pathogen, *Pseudocercospora herpotrichoides*, in the Pacific Northwest 1984 to 1990. *Plant Disease* 80:19-23. 1996.
- PEDROSO, C.A. & CAFÉ FILHO, A.C. *In vitro* reaction of Brazilian isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae* to copper and benomyl. *Fungicide & Nematicide Tests* 60: SMF 042 (publicação eletrônica). DOI: 10.1094/fn60. site:www.apsnet.org/online/ftests
- RUPPEL, E.G., JENKINS, A.D. & BURTCHE, L.M. Persistence of Benomyl-tolerant strains of *Cercospora beticola* in the absence of Benomyl. *Phytopathology* 70:25-26. 1980.
- SANTOS, G.R. & CAFÉ-FILHO, A.C. Reação de genótipos de melancia ao crestamento gomoso do caule mela. *Horticultura Brasileira* 23: 945-950. 2005.
- SANTOS, G.R., CAFÉ-FILHO, A.C., LEÃO, F.F., CESAR, M. & FERNANDES, L.E. Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. *Horticultura Brasileira* 23:230-234. 2005a.
- SANTOS, G.R., CAFÉ-FILHO, A.C. & SABOYA, L.M.F. Controle químico do crestamento gomoso do caule em melancia. *Fitopatologia Brasileira* 30:155-163. 2005b.
- SCHENK, N.C. Watermelon disease incidence in central Florida. *Plant Disease Reporter* 44:556-568. 1960.
- SCHENK, N.C. Epidemiology of gummy stem blight (*Mycosphaerella citrulina*) on watermelon: ascospore incidence and disease development. *Phytopathology* 58:1420-1422. 1968.
- SITTERLY, W.R. & KEINATH, A.P. Gummy stem blight. p.27-28. In: Zitter, T.A., Hopkins D.L. & Thomas C.E. (Eds.) *Compendium of Cucurbit Diseases*. Saint Paul MN. APS Press. 1996.
- SUMNER, D.R. & HALL, M.R. Resistance of watermelon cultivars to *Fusarium* wilt and gummy stem blight. *Biological and Cultural Tests* 8: 36. 1993. (Abstract)
- VAN STEEKELEMBURG, N.A.M. Influence of humidity on incidence of *Didymella bryoniae* on cucumber leaves and growing points under controlled environmental conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 91:253-264. 1985.
- VAN STEEKELEMBURG, N.A.M. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea* and *Didymella bryoniae* in cucumbers in the Netherlands. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 52:875-880. 1987.
- WEHNER, T.C. & ST. AMAND, P.C. Field tests for cucumber resistance to gummy stem blight in North Carolina. *HortScience* 28:327-329. 1993.