

AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DA TIMBAÚVA (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong): SINTOMATOLOGIA E TESTES DE INIBIÇÃO "in vitro" DO PATÓGENO.

César Augusto Guimarães Finger*
Elocy Minussi**

SUMMARY

*Inoculations carried out in a greenhouse with isolates of Colletotrichum causing antracnosis on "Timbaúva" tree (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) proved its pathogenicity. This fungus causes long, dark and depressed lesions on the stems, leaf abscission and death of the plants.*

A study of the conidia morphology, based on current taxonomic criteria, suggests the denomination "Colletotrichum dematum f. truncata (Schw.) (ensu ARX, 1957).

The "in vitro" micelial growth of the Colletotrichum was evaluated when subtited to 1, 10 and 100 ppm of several fungicides such as: Benomil, Mancozeb, Propineb and Triadimefon as well as some fungicides used in seed treatments such as PCNB, Lesan, RH 2161 and WL 47675.

The fungicide Benomil showed the highest efficiency on the treatment of the aerial parts of the plants and PCNB on the treatment of the seeds.

Based on the inhibition of mycelial growth observed, the approximate ED₅₀ doses range for each fungicide was calculated.

1. INTRODUÇÃO

A antracnose da Timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) incitada por **Colletotrichum** sp. foi constatada pela primeira vez em 1978 pela Profª Elocy Minussi (informação pessoal), causando sérios problemas em viveiros do Departamento de Ciências Florestais, da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Segundo GALVÃO (4), a Timbaúva é uma espécie potencialmente indicada para o reflorestamento por se tratar de uma leguminosa arborescente, pioneira e heliófila. Além disso, apresenta alto valor ecológico devido à fixação de nitrogênio e a rápida decomposição de seus restos vegetais, podendo, por essa razão, ser utilizada para a recuperação de "habitats degradados".

Como se trata de uma doença nova para a Timbaúva, carece de uma série de informações, tais como: características do agente causal, sintomatologia e controle efetivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de **Colletotrichum** sp. foi obtido de lesões típicas dos caules de Timbaúva e mantidos em tubos com meio de BDA (Batata-dextrose-ágar).

O inóculo foi desenvolvido em meio de BDA (KELMAN, 11; TUISTE, 9) sob luz contínua de uma Biotronette Mark III Environmental Chamber por 15 dias.

A inoculação foi feita por aspersão com um atomizador De Vilbiss, utilizando-se uma suspensão de esporos de 3×10^6 esporos/ml.

Antes do plantio as sementes de Timbaúva sofreram uma incisão com lâminas segundo TOLEDO & MARCOS FILHO (8), a fim de acelerar e uniformizar a germinação. A inoculação foi feita 15 dias após o plantio, utilizando-se três vasos com solo previamente esterilizado, cada vaso com duas plantas. Como testemunha foi utilizado um vaso com duas plantas sem inoculação.

A avaliação dos resultados foi feita 10 dias após a inoculação, determinando-se os sintomas característicos da moléstia.

No estudo da morfologia dos conídios de **Colletotrichum** empregou-se um isolado desenvolvido em meio de Batata-dextrose-ágar mantido por 15 dias sob luz contínua. Após 15 dias foram efetuadas as determinações do tamanho e largura de 100 conídios tomados ao acaso, através de uma ocular micrométrica "OKNOR" da Leitz, previamente calibrada para a objetiva de 40x. Calculou-se a

* Engenheiro Florestal, aluno do Curso de Pós-Graduação de Engenharia Florestal, da Universidade Federal do Paraná, PR.

** Professora do Departamento de Defesa Fitossanitária, da Universidade Federal de Santa Maria.

média das leituras e as respectivas medidas de dispersão, ou seja, desvio padrão (s), erro da média — $S(\bar{m})$ — e o coeficiente de variação (C.V. %).

O ensaio de efeito fungitóxico "in vitro" de alguns fungicidas sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. foi efetuado em duas etapas. Na primeira foram utilizados cinco produtos recomendados para o tratamento da parte aérea e cinco produtos recomendados para tratamento de sementes.

O isolado de *Colletotrichum* sp. proveniente da Timbaúva foi repicado para o centro de placas de Petri contendo o meio de batata-dextrose-ágar e, após uma semana de incubação em Biotronette Mark III Environmental Chamber, a região da colônia, em crescimento ativo, foi utilizada nos testes.

Para o preparo de meio de cultura com fungicida seguiu-se a técnica descrita por EDGINGTON et alii (3) com algumas modificações. Inicialmente dissolveu-se os fungicidas em 5,0 ml de acetona, completando-se o volume para 100 ml com água destilada esterilizada. Desta suspensão obteve-se por diluição as concentrações de 100, 10 e 1 ppm de cada fungicida em BDA fundente (45-47°C).

Os fungicidas testados para o tratamento da parte aérea foram: Benomil (metil — 1 — (butilcarbamoil) — 2 — benzimidazolcarbamato), com 50% de princípio ativo; Triadimefon (1(4 — cloro — fenoxi) — 3,3 — dimetil — 1 — (1 — H — 1 , 2 , 4 — triazol — 1 — il) — 2 — butanon), 25% p.a.; Maneb (etileno-bis-ditiocarbamato de manganês, 80 p.a. + Sulfato de zinco, 2,5% p.a.); Mancozeb (etileno-bis-ditiocarbamato de manganês, 80 p.a. + íon zinco, 2,0 p.a.); Propineb (propileno-bis-ditiocarbamato de zinco), 70% p.a.. Os produtos testados para tratamento de sementes foram: Captan — N (triclorometiltio) — 4 — ciclohexeno — 1,2 — dicarboximida, 75% p.a.; PCNB (pentacloro-nitrobenzeno), 75% p.a. + P — (dimetilamino) — benzenodíazo sulfonato de sódio, 10% p.a., e os produtos experimentais WL 47675, fornecido pela Shell Química, e RH 2161 (Sisthane), fornecido pela Rohm and Haas, contendo, respectivamente, 20% e 25% de ingredientes ativos ainda não liberados no mercado. Os

fungicidas WL 47675 e Sisthane (RH 2161) se apresentavam na forma líquida e os demais na forma de pó.

Após a solidificação do meio, cada placa foi inoculada centralmente com um disco de micélio de *Colletotrichum* sp. obtido através de um vasador de rocha de 4 mm de diâmetro. A incubação foi feita sob luz contínua, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 watts a 35 cm acima das placas e temperatura de 28-30°C. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Como testemunha utilizou-se placas contendo apenas BDA (batata-dextrose-ágar).

O desenvolvimento do fungo foi acompanhado detalhadamente, sendo encerradas as leituras aos sete dias após a inoculação, quando o crescimento do fungo atingiu os bordos das placas. Para observação do efeito fungistático dos produtos no desenvolvimento micelial das culturas foram feitas leituras diárias, determinando-se o diâmetro das culturas em mm.

O crescimento foi medido e comparado com as testemunhas correspondentes para calcular a porcentagem de inibição do crescimento (P.I.C.), que é expressa pela fórmula:

$$P.I.C. = \frac{\text{cresc. test.} - \text{cresc. trat.}}{\text{cresc. test.}} \times 100$$

(EDGINGTON et alii, 3).

Como os dados obtidos estão em porcentagem, para a análise de variância utilizou-se a transformação em arc sen $\sqrt{\%}$, sendo empregado o teste Tukey para a comparação das médias.

3. RESULTADOS

Os resultados do teste de inoculação realizado em casa de vegetação provou a patogenicidade do *Colletotrichum* sp.. Os sintomas nos caules se manifestam como lesões alongadas, deprimitas e escuradas, queda das folhas e morte das plantas (Figura 1). Sob as lesões, e com o auxílio de lupa, pode-se observar numerosos acérvulos do fungo.

Embora não tenham sido realizados testes de inoculações de sementes, foi observado que sementes aparentemente saudáveis podem dar origem a podridões no colo das plântulas e lesões escuras e deprimidas nos cotilédones.

O isolado de *Colletotrichum* sp. apresentou acérculos providos de setas (Figura 2) e conídios falcados unicelulares, hialinos e de aspecto granuloso (Figura 3). As dimensões médias (comprimento e largura) dos conídios, com as respectivas medidas de dispersão (desvio padrão, erro da média e o coeficiente de variação), são apresentadas na Tabela 1.

Os resultados do efeito de fungicidas recomendados para o tratamento da parte aérea e dosagens no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. encontram-se na Tabela 2.

Os dados em porcentagem foram transformados para arc sen $\sqrt{\%}$ e a análise de variância mostrou efeito significante, ao nível de 5%, entre fungicidas, dosagens e interação fungicidas x dosagem. O desdobramento dos graus de liberdade da interação mostrou efeito de fungicidas dentro de todas as dosagens estudadas, como se pode ver na Tabela 2, e efeito de dosagens sobre fungicidas, como pode ser verificado na Tabela 3.



FIGURA 1: Caules de Timbaúva (*E. contortissimum* (Vell.) Morong) com lesões escuras e alongadas, causadas por *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schw.) (sensu ARX, 1957).

TABELA 1: Dimensões médias dos conídios de *Colletotrichum* sp. cultivados em meio de BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sob luz contínua, com 15 dias de idade e respectivas medidas de dispersão da média.

COMPRIMENTO				LARGURA			
\hat{m}	S	$s(\hat{m})$	CV %	\hat{m}	S	$s(\hat{m})$	CV %
21,87	3,28	0,32	15,0	3,09	1,13	0,11	36,5

\hat{m} = média de 100 medições (em um)
S = desvio padrão

$s(\hat{m})$ = erro da média
CV % = coeficiente de variação

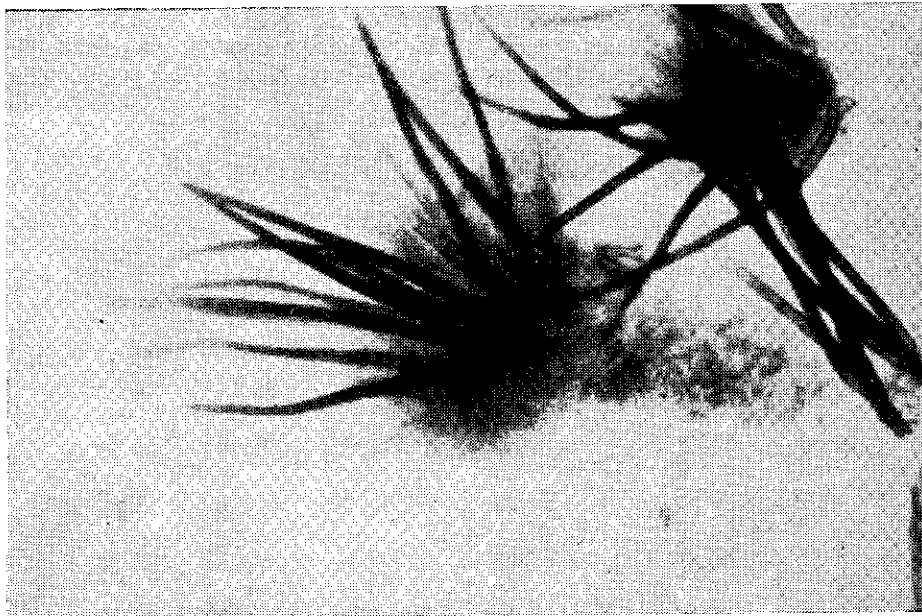


FIGURA 2: Acérvulos de *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schw.) (sensu ARX, 1957) isolado da Timbaúva (*E. contortisiliquum* (Vell.) Morong). (Aumento 610x).



FIGURA 3: Conídios de *Colletotrichum dematium* f. *truncata* isolado da Timbaúva (*E. contortisiliquum* (Vell.) Morong). Aumento de 640x).

TABELA 2: Efeito de fungicidas testados para o tratamento da parte aérea e dosagens na porcentagem de inibição de crescimento micelial (P.I.C.)* de *Colletotrichum* sp. "in vitro" e efeito de fungicidas para cada dosagem.

FUNGICIDAS	DOSAGENS DO PRINCÍPIO ATIVO EM ppm						MÉDIA	
	1		10		100			
	P.I.C.**	arc sen $\sqrt{\%}$	P.I.C.	arc sen $\sqrt{\%}$	P.I.C.	arc sen $\sqrt{\%}$		
Benomil	83,75	66,66 ab***	86,50	68,88 a	76,25	61,21 b	65,58 a	
Mancozeb	10,00	17,45 b	7,50	16,11 a	56,50	49,04 a	27,53 b	
Propineb	1,00	6,33 c	14,75	22,90 b	60,75	51,50 a	26,81 b	
Maneb	2,50	8,45 c	11,00	19,70 b	33,25	35,38 a	21,18 c	
Triadimefon	0,25	4,76 b	3,50	10,16 b	14,25	22,18 a	12,37 d	

* Dados transformados em arc sen %.

** Média de cinco repetições.

*** Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Tukey. C.V. % = 13,74.

TABELA 3: Efeito de dosagens para cada fungicida (dados transformados em arc sen $\sqrt{\%}$) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. "in vitro".

DOSAGEM DO p.a. (em ppm)	F U N G I C I D A S				
	Benomil	Mancozeb	Propineb	Maneb	Triadimefon
1	66,66* ab**	17,45 b	6,33 c	8,45 c	4,76 b
10	68,88 a	16,11 b	22,90 b	19,70 b	10,16 b
100	61,21 b	49,04 a	51,50 a	35,38 a	22,18 a

* Média de cinco repetições.

** Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Tukey. C.V.% = 13,74.

TABELA 4: Efeito de fungicidas testados para o tratamento de sementes e dosagens na porcentagem de inibição de crescimento micelial (P.I.C.) de *Colletotrichum* sp. "in vitro" e efeito de fungicidas para cada dosagem.*

FUNGICIDAS	DOSAGENS DO PRINCÍPIO ATIVO EM pmm						MÉDIA	
	1		10		100			
	P.I.C.**	arc sen $\sqrt{\%}$	P.I.C.	arc sen $\sqrt{\%}$	P.I.C.	arc sen $\sqrt{\%}$		
PCNB	15,99	23,96 c	60,93	51,61 b	74,82	60,22 a	45,26 a	
Lesan	1,89	8,16 b	51,75	46,29 a	56,93	49,30 a	34,58 b	
RH 2161	0,00	4,05 c	12,23	20,72 b	71,29	57,94 a	27,57 c	
Captan	3,99	11,61 b	9,17	16,35 b	45,03	42,42 a	23,46 d	
WL 47675	3,52	11,47 b	3,05	10,78 b	38,58	38,69 a	20,31 d	

* Dados transformados em arc sen %.

** Média de cinco repetições.

*** Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Tukey. C.V. % = 11,38.

TABELA 5: Efeito de dosagens para cada fungicida (dados transformados em arc sen $\sqrt{\%}$) na porcentagem de inibição de crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. "in vitro".

DOSAGEM DO p.a. (em ppm)	FUNGICIDAS				
	PCNB	LESAN	RH 2161	CAPTAN	WL 47675
1	23,96* c**	8,16 b	4,05 c	11,61 b	10,78 b
10	51,61 b	46,29 a	20,72 b	16,35 b	11,47 b
100	60,22 a	49,30 a	57,94 a	42,42 a	38,69 a

* Média de cinco repetições.

** Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Tukey. C.V. % = 11,38.

Os dados apresentados na Tabela 2, em porcentagem de inibição de crescimento micelial (P.I.C.), permitem, por sua simples observação, saber em que faixa de concentração se localiza o ED₅₀ dos produtos testados em relação a *Colletotrichum* sp.. Entende-se por ED₅₀ a dose do fungicida suficiente para inibir em 50% o crescimento micelial do fungo. Assim, para as condições em que foi realizado o ensaio, no tempo de sete dias, o ED₅₀ para o Benomil encontra-se abaixo de 1 ppm, para o Mancozeb e Propineb entre 10 e 100 ppm, para o Maneb acima de 100 ppm e para o Triadimefon bem acima de 100 ppm.

Os dados (transformados em arc sen $\sqrt{\%}$) dos fungicidas testados para tratamento de sementes mostraram efeito significativo, ao nível de 5%, entre fungicidas, dosagens e interação fungicidas x dosagem. O desdobramento dos graus de liberdade mostrou efeito dos fungicidas dentro de todas as dosagens estudadas e efeito de dosagens sobre fungicidas (Tabelas 4 e 5).

A faixa de concentração onde se localiza o ED₅₀ dos produtos testados em relação a *Colletotrichum* sp., determinados em porcentagem de inibição de crescimento micelial (P.I.C.), no tempo de sete dias, mostram que o ED₅₀ para o PCNB e Lesan encontra-se entre 1 e 10 ppm, para RH 2161 entre 10 e 100 ppm e para Captan e WL 47675 acima de 100 ppm.

4. DISCUSSAO

As dimensões dos conídios, conforme resultados da Tabela 1, estão dentro dos limites estabelecidos por ARX (1) para *Colletotrichum dematum*. Esse autor, em sua revisão taxonômica do gênero *Colletotrichum* e baseando-se nos trabalhos de TIFFANY & GILLMAN (7), agrupou as espécies com conídios fusiformes, com largura média de 4 micrômetros, numa espécie única, *Colletotrichum dematum*, dentro da qual *C. dematum* f. *truncata* é a forma especializada sobre leguminosas.

Embora se tenha trabalhado com apenas um isolado de *Colletotrichum* e não se tenha feito testes de inoculação cruzada com outras leguminosas, os resultados do presente trabalho, sob o ponto de vista da morfologia dos conídios, concordam com os trabalhos de ARX (1), além da Timbaúva ser uma leguminosa arborescente. Além disso, segundo JOHNSON (6), a morfologia tem sido o principal critério de classificação e somente estes caracteres devem ser usados para delimitar espécies e taxa superiores.

Os resultados do efeito fungistático "in vitro" dos fungicidas recomendados para tratamento da parte aérea demonstraram que o fungicida Benomil foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum* isolado da Timbaúva. No entanto, deve-se estar prevenido para a possibilidade do desenvolvimento de linhagens resistentes a Benomil, o que já é conhecido para vários fungos (BOLLEN & FUCHS, 2; GEORGOPOULOS & DOVAS, 5; REMIRO & KIMATI, 10).

Sendo o ED₅₀ um parâmetro importante para um produto com capacidade fungitóxica, além do seu valor calculado em um dado instante (Tabela 2), foi determinada a faixa onde se enquadra o seu valor em função da taxa de crescimento micelial do fungo nas diferentes dosagens dos fungicidas. Como a taxa de crescimento da testemunha (O ppm) foi de 11,4mm/dia, o ED₅₀ seria a dosagem que possibilitasse o crescimento do fungo a uma taxa de 5,7mm/dia. Desta maneira o ED₅₀ de Benomil está bem abaixo de 1 ppm; para o Mancozeb, está acima de 100 ppm; para o Propineb e Maneb entre 10 e 100 ppm e para o Triadimefon acima de 100 ppm.

De acordo com EDGINGTON et alii (3), fungos que apresentem ED₅₀ de 50 ppm ou mais podem ser considerados como insensíveis ao fungicida testado; aqueles com ED₅₀ entre 1 e 10 ppm como moderadamente sensíveis. Assim, *Colletotrichum* mostrou-se altamente sensível a Benomil, insensível ao Mancozeb e a Triadimefon e insensível a Propineb e Maneb.

Os resultados do efeito fungistático "in vitro" dos fungicidas recomendados para tratamento de sementes demonstraram que o fungicida PCNB foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial de **Colletotrichum**. Foi determinado, também a faixa onde se enquadra o ED₅₀, em função da taxa de crescimento micelial do fungo nas diferentes dosagens dos fungicidas.

Como a taxa de crescimento da tes temunha (O ppm) foi de 12,14 mm/dia, o ED₅₀ seria a dosagem que possibilitasse o crescimento do fungo a uma taxa de 6,07mm/dia. Desta maneira, o ED₅₀ de PCNB e Lesan está entre 1 e 10 ppm, o RH 2161 entre 10 e 100 ppm e Captan e WL 47675 acima de 100 ppm. Deste modo, de acordo com EDGINGTON et alii (3), **Colletotrichum** mostrou-se moderadamente sensível aos fungicidas PCNB e Lesan e insensível aos demais fungicidas testados.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos pode-se tirar as seguintes conclusões:

- 1 — Em conformidade com as características morfológicas discutidas, o isolado de **Colletotrichum** da Timbaúva foi denominado **Colletotrichum dematum f. truncata** (Schw.) (sensu ARX, 1957).
- 2 — Os testes de inoculação realizados em casa de vegetação provaram a patogenicidade do fungo na Timbaúva (**Enterolobium contortisiliquum**).

3 — Os testes de inibição do crescimento micelial "in vitro" mostraram que o Benomil foi o fungicida mais eficiente para tratamento da parte aérea e o PCNB para o tratamento de sementes.

6. RESUMO

Inoculações realizadas em casa de vegetação com um isolado de **Colletotrichum** causando antracnose em Timbaúva (**Enterolobium contortisiliquum** (Vell.) Morong) provaram a sua patogenicidade. Este fungo determina lesões alongadas, escuras e deprimidas nos caules, queda das folhas e morte das plantas.

O estudo da morfologia dos conídios e com base nos critérios taxonômicos sugere-se a denominação de **Colletotrichum dematum f. truncata** (Schw.) (sensu ARX, 1957).

Avaliou-se o crescimento micelial de **Colletotrichum** "in vitro", quando submetido as dosagens de 1, 10 e 100 ppm de fungicidas recomendados para o tratamento da parte aérea, como Benomil, Mancozeb, Propineb e Triadimefon, e fungicidas recomendados para tratamento de sementes, como PCNB, Lesan, RH 2161, Captan e WL 47675.

O fungicida Benomil revelou-se o mais eficiente para o tratamento da parte aérea e o PCNB para o tratamento de sementes.

A partir das reduções do crescimento obtidas calculou-se as faixas aproximadas de localização do ED₅₀, em função da taxa de crescimento micelial, para os diferentes princípios ativos.

7. LITERATURA CITADA

1. ARX, J.A. von. Die Arten der Gattung **Colletotrichum** Cda. **Phytopathol. Z.**, 29:413-469, 1957.
2. BOLLEN, G.J. & FUCHS, A. On the specificity of the in vitro antifungal activity of benomyl. **Neth. J. Plant. Pathol.**, 76: 299-313, 1970.
3. EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopatology**, 61:42-44, 1971.
4. GALVÃO, F. Contribuição para a auto-ecologia de **Enterolobium contortisiliquum** (Vell.) Morong (Timbaúva). Tese (Mestre em Ciências — Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1979. 86 p.

5. GEORGOPoulos, S.G. & DOVAS, C. A serious outbreak of strains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazole fungicides. *Plant Dis. Reporter*, 57:321-324, 1973.
6. JOHNSON, T. Host Specialization as a taxonomic criterion. In: AINSWORTH, C.C. & SUSSMAN, A.S., Ed. *The Fungi. An Advanced Treatise*. New York and London, Academic Press, 1968, v. 3, p. 543-556.
7. TIFFANY, L.H. & GILMAN, J.C. Species of *Colletotrichum* of legumes. *Mycologia*, 46:52-75, 1954.
8. TOLEDO, F.F. de & MARCOS FILHO, J. *Manual das Sementes — Tecnologia da Produção*. São Paulo, Edit. Agronômica Ceres, 1977. 224 p.
9. TUITE, J. *Plant Pathological Methods, Fungi and Bacteria*. Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1969. 239 p.
10. REMIRO, D. & KIMATI, H. Resistência a benomil e tiofanato em *Micosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. *O Biológico*, 40:22-24, 1974.
11. KELMAN, A. *Surcebook of laboratory exercises in plant pathology*. San Francisco, Freeman, 1967, 387 p.