

SENSIBILIDADE MICELIAL *IN VITRO* DE *Cercospora beticola* AO OXICLORETO DE COBRE

Leandro Alvarenga Santos^{2*}; Janaina Marek¹; Laís Cristine Werner²; Lívia Costa Mariano¹; Cacilda Marques Duarte Rios Faria²

SAP 14306 Data envio: 06/06/2016 Data do aceite: 19/08/2016
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 2, abr./jun., p. 153-157, 2017

RESUMO - A cercosporiose, ou mancha de cercospora, causada por *Cercospora beticola*, é a doença foliar mais comum no cultivo de beterraba. O objetivo desta pesquisa foi determinar a sensibilidade micelial *in vitro*, medida pela IC₅₀ (concentração para inibir 50% do crescimento miceliano do fungo) de três isolados de *C. beticola*, obtidos de folhas de beterraba na região de Guarapuava (PR), ao fungicida protetor oxiclureto de cobre usado no controle da mancha de cercospora, bem como a produção de cercosporina. Foram testadas seis concentrações de oxiclureto de cobre (1.260,0 ppm, 126,0 ppm, 12,6 ppm, 1,26 ppm, 0,126 ppm e 0,00 ppm do ingrediente ativo). A concentração de 0,00 ppm representou a testemunha, sem adição de fungicida e a de 1260,0 representou a dose de campo recomendada. A avaliação do crescimento micelial foi realizada medindo-se o diâmetro das colônias, quando o crescimento do fungo no tratamento testemunha atingiu a borda da placa de Petri. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Quanto à fungitoxicidade das doses testadas do ingrediente ativo oxiclureto de cobre, evidenciou-se que para os três isolados, a IC₅₀ de oxiclureto de cobre alcançou valores de sensibilidade. Para análise da cercosporina não foi verificada diferença significativa para os diferentes isolados e as diferentes concentrações de oxiclureto de cobre.

Palavras-chave: *Beta vulgaris* L., fungicida cúprico, fungitoxicidade, IC₅₀, mancha de cercospora.

MYCELIAL SENSITIVITY of *Cercospora beticola* to COPPER OXYCHLORIDE

ABSTRACT - Cercospora leaf spot or Cercospora spot, caused by *Cercospora beticola* Sacc is the most common disease in the leaf beet cultivation. This study aimed to determine the mycelial sensitivity *in vitro*, measured by the IC₅₀ (concentration for 50% inhibition of mycelial fungus growth) of five isolates of *C. beticola* of sugarbeet leaves obtained in Guarapuava region (PR) to the fungicide copper oxychloride used for controlling the Cercospora spot as well as the production of cercosporin. We tested six copper oxychloride concentrations (1260.0 ppm, 126.0 ppm, 12.6 ppm, 1.26 ppm, 0.126 ppm and 0.00 ppm of the active ingredient). The concentration of 0.00 ppm represents the control without addition of the fungicide and 1260.0 represented the recommended field dose. The assessment of mycelial growth was carried out measuring the diameter of the colonies, where the fungal growth in the control treatment has reached the border of the petri dish. The experimental design was completely randomized with three replications. As for the fungus toxicity of the tested copper oxychloride active ingredient doses, it became clear that for the three isolated IC₅₀ copper oxychloride reached sensitivity values. For analysis of cercosporin was no significant statistical difference for the different isolates and different concentrations of copper oxychloride.

Key words: *Beta vulgaris* L., copper fungicide, fungitoxic, IC₅₀, cercospora spot.

INTRODUÇÃO

A beterraba (*Beta vulgaris* L.), cultivada em vários países, é originária de regiões de clima temperado com uma temperatura ótima para seu desenvolvimento próxima a 20 °C, recomendando-se solos areno-argilosos ou argilo-arenosos, friáveis e bem drenados (TIVELLI et al., 2011). O principal problema fitossanitário da cultura da beterraba é a cercosporiose, doença causadora de danos significativos à cultura. A cercosporiose, ou mancha de cercospora é uma doença causada pelo fungo *Cercospora beticola* Sacc. (FELIPINI, 2011).

Em estudo de May de Mio et al. (2008), a severidade desta doença causou uma redução na produtividade de 23,61% na região metropolitana de Curitiba. O fungo sobrevive em restos culturais e dissemina-se pelo vento e respingos da chuva ou irrigação, aspectos importantes para decidir o manejo adequado para o controle desta doença (FILGUEIRA, 2003). A medida de controle mais utilizada para esta doença, assim como para a grande maioria das doenças em culturas de importância econômica, é o uso de fungicidas, pois a maioria das cultivares disponíveis são suscetíveis à doença.

¹Mestre em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO, Rua Simeão Camargo Varela de Sá 03, Vila Carli, Guarapuava, Paraná, Brasil. E-mail: janainamarek@yahoo.com.br; liviacmariano@yahoo.com.br

²Professor, UNICENTRO. E-mail: leandro.alvarenga.s@hotmail.com; criosfaria@hotmail.com; lais.werner@cctg.com.br. *Autor para correspondência

Dentre os fungicidas registrados para controle da mancha de cercospora temos protetores, erradicantes e sistêmicos, quando se avalia a sua ação no alvo (planta) (JULIATTI, 2005). O oxiclreto de cobre está entre os produtos da categoria protetora e age através da inativação de enzimas essenciais (FRY et al., 1979), mecanismo de ação considerado não específico e, portanto, com baixo risco de selecionar organismos resistentes. Entretanto, segundo Reis et al. (2010), vem sendo observada a redução da eficiência de controle associada à seleção de isolados de muitos fungos fitopatogênicos. A resistência do agente causal da mancha de cercospora na beterraba à fungicidas, já é um fenômeno conhecido, relatado em muitas regiões produtoras (BOLTON, 2012).

Diferentes critérios têm sido utilizados para avaliar a sensibilidade à fungicidas. Muitas pesquisas determinam a concentração inibitória (IC) do fungicida testado, a qual é resultado da estimativa da concentração média do ingrediente ativo que é eficaz na inibição de 50% do crescimento da população amostrada (valores de IC_{50}), sendo sua finalidade fornecer uma estatística universalmente comparável para diferenciar os níveis de sensibilidade para toxinas entre as diferentes populações (PFEUFER; NGUGI, 2012).

Além disso, na membrana plasmática vegetal, em resposta ao ataque de fitopatógenos, pode haver a ação de fitotoxinas que auxiliam no processo infeccioso, sendo a cercosporina uma fitotoxina que quando incidida pela luz é convertida à sua forma energeticamente ativa, podendo reagir com oxigênio molecular e produzir espécies reativas de oxigênio, as quais destroem as membranas celulares do hospedeiro (FELIPINI, 2011).

Diante do exposto, objetivou-se com o trabalho investigar *in vitro* a sensibilidade de isolados de *Cercospora beticola* ao fungicida protetor oxiclreto de cobre no controle da mancha de cercospora, bem como a produção de cercosporina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Agronomia (DEAGRO) da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, Paraná. Os isolados de *Cercospora beticola* foram obtidos de material vegetal infectado, coletado de folhas de beterraba da região de Guarapuava (PR), denominados CB-01, CB-03 e CB-07.

O isolamento foi realizado seguindo a metodologia descrita por Santos et al. (2014). Após este procedimento, colônias do patógeno foram identificadas através de características morfológicas e repicadas em meio suco de tomate (ST), preparado com 100 ml de suco de tomate, 3 g de carbonato de cálcio, 20 g de ágar e 900 ml de água destilada, a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

A sensibilidade ao fungicida foi avaliada com base na inibição do crescimento micelial em meio BDA (batata dextrose-ágar), autoclavado a 121 °C por 40 min, e após foi incorporado as concentrações do fungicida e vertido em placas de Petri (FERNANDEZ, 1993). Após a solidificação, um disco de micélio dos diferentes isolados com 5 mm de diâmetro, foi posicionado no centro de cada placa de Petri.

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e seis tratamentos, sendo eles compostos pelas concentrações de oxiclreto de cobre a: 0 ppm, correspondente a testemunha do ensaio, 1,260 ppm, sendo a dose de campo, 126 ppm, 12,6 ppm, 1,26 ppm e 0,126 ppm, onde cada placa de Petri, com sua respectiva dose e isolado, compunham uma unidade experimental. As placas foram mantidas a 25 °C em incubadora BOD, em fotoperíodo de 12 h.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada com o auxílio de paquímetro digital, medindo-se o diâmetro das colônias em duas direções perpendiculares, sendo esta avaliação interrompida, quando o crescimento do fungo no tratamento testemunha atingisse a borda da placa de Petri. Com as medidas do diâmetro da colônia de *C. beticola* em cada tratamento, os valores de IC_{50} (Tabela 1) foram calculados através da análise de regressão, ajustando-se o modelo linear.

A avaliação da produção de cercosporina (cor vermelha) foi realizada aos 28 dias e avaliada numa escala de 1 a 4 (Figura 1) conforme metodologia de Souza et al. (2012).

O experimento foi realizado duas vezes e a média dos dois testes foi utilizada na análise estatística. A análise de regressão logarítmica para a concentração que inibiu 50% (IC_{50}) do crescimento do micélio do fungo foi estimada através do programa Excel[®] calculado a partir de equações geradas. Os dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e, quando significativos, à análise de regressão, através do programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011).

TABELA 1. Efeito do oxiclreto de cobre sobre o índice de crescimento micelial de *Cercospora beticola*.

Isolado	Sensibilidade micelial			
	r^2 (%)	IC_{50} (ppm) ^a	S ^b	E ^c
CB01	0,94	654,76	I	I
CB04	0,90	670,80	I	I
CB07	0,96	672,09	I	I

Em que: ^aCálculo da IC_{50} (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial); ^bSensibilidade do fungo aos fungicidas (AS: alta sensibilidade; BS: baixa sensibilidade; MS: moderada sensibilidade e I: insensibilidade); ^cEficiência do fungicida (AE: alta eficiência; ME: moderada eficiência; BE: baixa eficiência e I: insensibilidade).

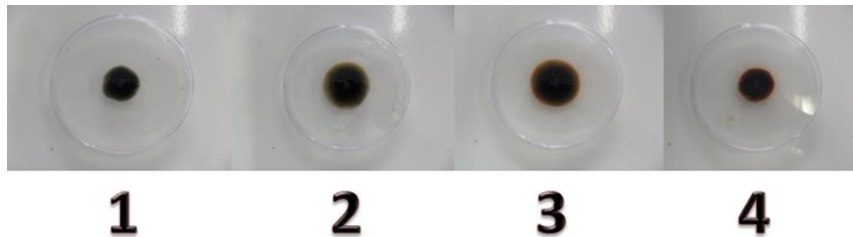


FIGURA 1 - Escala visual para avaliação de cercosporina. Adaptado de Souza et al. (2012).

De acordo com os resultados da IC_{50} , os isolados de *C. beticola* foram classificados em quatro categorias de sensibilidade à fungicidas, de acordo com a escala de Bampi et al. (2013), em que: $IC_{50} < 1$ ppm: alta sensibilidade (AS); IC_{50} 1-10 ppm: moderada sensibilidade (MS); IC_{50} 10-50 ppm: baixa sensibilidade (BS); $IC_{50} > 50$ ppm: insensibilidade (I). E também em quatro categorias,

com o mesmo intervalo de concentração/ppm, com relação à eficiência do fungicida, proposta por Parisi (1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sensibilidade *in vitro* dos produtos testados sobre o crescimento micelial dos isolados de *C. beticola* diferiu entre as doses testadas, podendo ser observados nas regressões específicas para cada isolado (Figura 2).

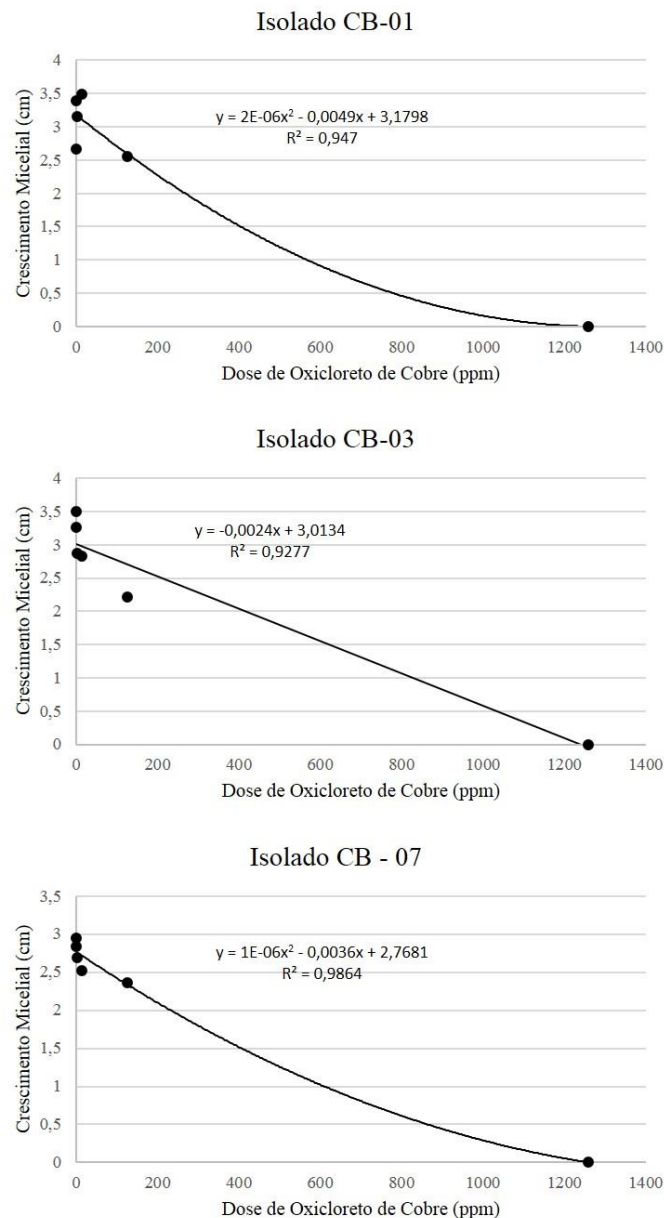


FIGURA 2 - Representações gráficas do crescimento micelial de três isolados de *Cercospora beticola*, submetidos a seis diferentes concentrações de oxiclreto de cobre. A: isolado CB01; B: isolado CB04 e C: isolado CB07.

A dose de campo (1260 ppm) do fungicida foi altamente eficaz para os três isolados testados, apresentando 100% de inibição do crescimento micelial *C. beticola* (Figura 2). De acordo com Silva et al. (2006) os fungicidas protetores, como o oxiclureto de cobre atuam como protetores e sua ação tóxica é exercida sobre a

germinação dos esporos, na formação do tubo germinativo e do apressório, em suma, este tipo de produto possui ação antes da penetração do patógeno. Neste trabalho, as doses do fungicida protetor oxiclureto de cobre foram eficazes na inibição do crescimento micelial dos isolados de *C. beticola* (Figura 3).

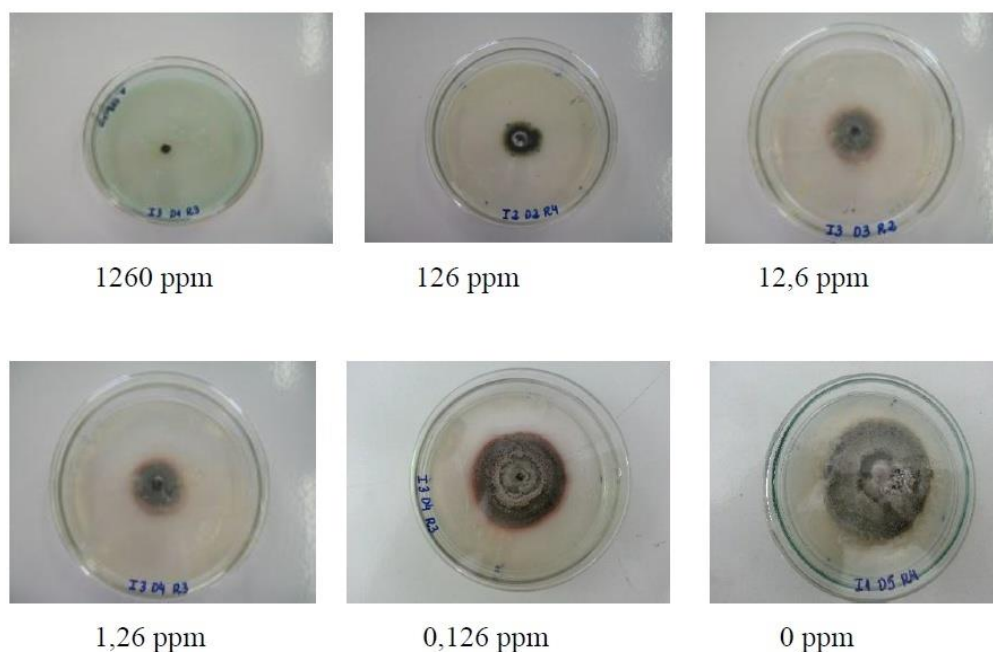


FIGURA 3 - Crescimento micelial de isolados de *Cercospora beticola*, em meio de cultura contendo diferentes concentrações de oxiclureto de cobre.

Os coeficientes de determinação apresentaram variação de 0,94 a 0,96%. Dentre os resultados obtidos, os três isolados apresentaram a IC_{50} de oxiclureto de cobre que alcançou valores de sensibilidade, os quais, segundo Bampi et al. (2013), são considerados insensíveis, ou não tóxicos ao fungo, da mesma forma com relação à eficiência, por Parisi (1997), todos isolados apresentaram-se insensíveis a IC_{50} .

A classificação de “insensível” dos isolados de *C. beticola* a oxiclureto, pode ser explicada pela natureza do composto. Ambos os trabalhos, Bampi et al. (2013) e Parisi (1997), descreveram limites de IC_{50} para a classificação de sensibilidade para compostos de natureza sistêmica, o oxiclureto como já citado possui natureza protetora. Reis et al. (2010) descrevem que uma das diferenças entre fungicidas sistêmicos e protetores é a concentração de ingrediente ativo, fungicidas protetores por conceito possuem concentração efetiva maior que os sistêmicos.

Devido à fatores genéticos, um fungo pode ser sensível ou não a uma determinada molécula. Se for sensível a um determinado fungicida, ele exibe fungitoxicidade, caso contrário, é determinado como não tóxico. Da mesma forma, se o fungicida não mostra fungitoxicidade, o fungo é então considerado insensível (TONIN et al., 2013). Nem todos os produtos químicos são tóxicos para os fungos, assim como não existe um único fungicida comercial capaz de controlar todos os fungos

(FERREIRA et al., 2009). Trabalho elaborado por Tavares e Souza (2005) testando o controle *in vitro* da antracnose do mamoeiro, concluíram que para o oxiclureto de cobre, a IC_{50} foi de 38,46 ppm, sendo encaixada na categoria de baixa eficiência no controle deste fungo na classificação proposta para fungicidas sistêmicos.

A eficiência do oxiclureto de cobre foi observada em um experimento com *Didymella bryoniae*, uma vez que este apresenta maior número de sítios de ação celular e metabólica, sendo, portanto, seguro contra o surgimento de isolados resistentes (SANTOS et al., 2006).

Pozza et al. (1997) testaram vários fungicidas em mudas de café em viveiro para o controle do olho pardo e observaram um efeito positivo na retenção de folhas, quando aplicado o oxiclureto de cobre a 1500 g i.a./ha, amenizando o problema da desfolha causada pela doença.

Em trabalho elaborado por Patricio (2011) testando o efeito de diferentes fungicidas sobre o controle da cercosporiose em mudas de café, observou-se que o oxiclureto de cobre foi o princípio ativo menos eficiente e teve menor efeito residual que os demais produtos testados. O tratamento com oxiclureto de cobre apresentou incidência de cercosporiose de 46,1%, contra valores inferiores a 4,4% nos demais fungicidas testados.

Para análise da cercosporina não foi verificada diferença estatística significativa para os diferentes isolados e as diferentes concentrações de oxiclureto de

cobre (dados não apresentados). Sendo assim, o oxiclreto não influenciou a produção desta toxina.

A cercosporina é um pigmento de coloração vermelha, sendo produzida na presença de luz, é uma toxina produzida por fungos do gênero cercospora, incluindo *C. beticola*, esta toxina é considerada como um fator de patogenicidade, atuando no processo de colonização. Quando na existência de luz, a cercosporina torna-se ativa e pode apresentar interação com outras moléculas sendo o principal alvo de reação o oxigênio, que em reação com a cercosporina, é transformado em espécies de oxigênio reativas, de alto nível tóxico por interatuar e danificar macromoléculas como DNA e proteínas, além de causar danos nas membranas celulares do hospedeiro (DAUB; EHRENSHAFT, 2000).

Neste biosensaio, como já era esperado, houve a inibição total do crescimento do fungo apenas na concentração utilizada para aplicação a campo, as outras diluições em série, as quais apresentavam menor concentração do princípio ativo, não foram capazes de inibir completamente o crescimento micelial.

A sensibilidade reduzida de *C. beticola* ao oxiclreto aqui apresentada evidencia a possível ocorrência de seleção de organismos resistentes. A utilização de fungicidas com eficácia comprovada e de diferentes modos de ação, é importante em relação ao manejo de resistência de fungos a fungicidas. São poucos os estudos científicos que têm relatado o desempenho de fungicidas para o controle de *C. beticola*, portanto, o monitoramento da sensibilidade deste organismo em diferentes regiões e ao longo do tempo se faz necessário. A busca de produtos que controle este patógeno e a identificação dos isolados quanto à sensibilidade aos fungicidas disponíveis é de grande importância para assegurar a viabilidade econômica da cultura da beterraba.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o oxiclreto de cobre para controlar a cercosporiose em beterraba mediante a aplicação de sua dose recomendada a campo (1260 ppm) é eficaz para os três isolados testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAMPI, D.; CASA, R.T.; WORDELL FILHO, J.A.; BLUM, M.M.C.; CAMARGO, M.P.de. Sensibilidade de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.29, n.4, p.787-795, jul./ago. 2013.

BOLTON, M.D.; RIVERA-VARAS, V.; DEL RÍO MENDOZA, L.E.; KHAN, M.F.; SECOR, G.A. Efficacy of variable tetraconazole rates against *Cercospora beticola* isolates with differing *in vitro* sensitivities to DMI fungicides. **Plant Disease**, v.96, n.12, p.1749-1756, 2012.

DAUB, M.E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, n.1, p.461-490, 2000.

FERNANDEZ, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, J.B.; ABREU, M.S.de; PEREIRA, I.S.; FERNANDES, K.D.; PEREIRA, R.B. Sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* (mancha manteigosa do cafeeiro) a diferentes concentrações de fungicidas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, edição especial, p.2052-2058, 2009.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2.ed. rev. e ampl. Viçosa: UFV, 2003. 412p.

FILIPINI, R.B. **Avaliação de indutores de resistência para o controle da sarna da macieira (*Venturia inaequalis* Cke.) e da cercosporiose da beterraba (*Cercospora beticola* Sacc.)**. 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FRY, W.E.; BRUCK, R.I.; MUNDT, C.C. Retardation of potato late blight epidemics by fungicides with eradicant and protectant properties. **Plant Disease Report**, v.63, p.970-974, 1979.

JULIATTI, F.C. Modo de ação dos fungicidas. In: **Simpósio sobre Relações entre Nutrição Mineral e incidência de doenças de plantas**. Potafos: Piracicaba, 2005.

MAY DE MIO, L.L.; OLIVEIRA, R.A.; FLORIANI, A.M.V.; SCHUBER, J.M.; POLTRONIERI, A.S.; ARAUJO, M.A.; TRATCH, R. Proposta de escala diagramática para quantificação da cercosporiose da beterraba. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.3, p.331-337, 2008.

PARISI, J.J.D. **Sensibilidade *in vitro* de *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* a fungicidas e efeito do tratamento de sementes de soja (*Glycine max*) inoculadas com patógenos**. 1997. 61f. Dissertação (Mestrado em Micologia Agrícola) - Escola Superior de Agronomia "Luis de Queiroz", Piracicaba, 1997.

PATRICIO, F.R.A.; BRAGHINI, M.T. Efeito de fungicidas triazóis sobre o controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.2, p.241-249, abr./jun. 2011.

PFEUFER, E.E.; NGUGI, H.K. Orchard factors associated with resistance and cross resistance to sterol demethylation inhibitor fungicides in populations of *Venturia inaequalis* from pennsylvania. **Disease Control and Pest Management**, v.102, n.3, 2012.

POZZA, A.A.A.; ZAMBOLIN, L.; POZZA, E.A.; COSTA, H.; VALE, F.X.R.do. Controle químico da mancha de olho pardo (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.543-5, 1997.

REIS, E.M.; REIS, A.C.; CARMONA, M.A. **Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. Passo Fundo: UPF, 2010.

SANTOS, L.A.; SOUZA, P.E.; POZZA, E.A.; CALDEIRA, D.M.; BOTELHO, D.M.S. Nova técnica para isolar *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, agente etiológico da Cercosporiose do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v.9, n.1, p.142-144, 2014.

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

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

SOUZA, A.G.C.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. **Journal of Phytopathology**, v.160, n.10, p.540-546, 2012.

TAVARES, G.M.; SOUZA, P.E.de. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.1, p.52-59, jan./fev. 2005.

TIVELLI, S.W.; FACTOR, T.L.; TERAMOTO, J.L.S.; FABRI, E.G.; MORAES, A.R.A.de; TRANI, P.E.; MAY, A. **Beterraba: do plantio à comercialização**. Instituto Agrônomo: Campinas. Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 210, 2011.

TONIN, R.F.B.; AVOZANI, A.; DANELLI, A.L.D.; REIS, E.M.; ZOLDAN, S.M.; GARCÉS-FIALLOS, F.R. *In vitro* mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.43, n.4, p.460-466, out./dez. 2013.