

Ação fungitóxica de fungicidas na germinação de uredosporos de *Puccinia hemerocallidis*

Fungitoxic action of fungicides on the germination of Puccinia hemerocallidis urediniospores

Roberta Sabatino Ribeiro^{1*}, Ricardo Trezzi Casa², Aike Anneliese Kretzschmar², Daiana Bampi³, Fabiane Nunes Silveira⁴, Edimara Fossá⁵

Recebido em 18/02/2013; aprovado em 04/07/2014.

RESUMO

Na cultura do hemerocale a ferrugem, causada por *Puccinia hemerocallidis*, é a principal doença foliar. A aplicação de fungicidas é um dos métodos de controle desta doença. No entanto, no Brasil há poucos estudos avaliando o seu efeito no controle deste patógeno. O objetivo foi determinar a concentração inibitória (CI₅₀ e a CI₁₀₀) de oito produtos sobre a germinação de uredosporos de *P. hemerocallidis*. Testaram-se os fungicidas: azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol e tebuconazol; e ainda o pó de rocha, todos nas concentrações de 0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mg L⁻¹. Os produtos foram diluídos sucessivamente até se obter as concentrações desejadas, misturados em meio ágar-água e após a solidificação da mistura em placas de Petri acrescentou-se a suspensão de uredosporos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Em microscópio óptico foram analisados 100 uredosporos por placa de Petri. Os dados foram submetidos a análise de regressão. Todos os fungicidas do grupo químico das estrobilurinas (azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina) e o tebuconazol apresentaram

elevada fungitoxicidade a uredosporos de *P. hemerocallidis*, e os fungicidas ciproconazol e epoxiconazol, bem como o pó de rocha, apresentaram ação moderadamente fungitóxica.

PALAVRAS-CHAVE: Ferrugem do hemerocale, fungicidas, pó de rocha, concentração inibitória.

SUMMARY

The daylily rust culture, caused by *Puccinia hemerocallidis*, is a major foliar disease. The application of fungicide is the method of control of this disease, however, in Brazil there are little recent studies evaluating the control of this pathogen. The objective was to determine the inhibitory concentration (IC₅₀ and IC₁₀₀) of eight products on the germination the *P. hemerocallidis* urediniospores. Fungicides azoxystrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, cyproconazole, epoxiconazole and tebuconazole were tested; in addition to the rock dust, all at concentrations of 0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg L⁻¹. The products were diluted successively to obtain the desired concentrations, mixed in water-agar media and after solidifying the mixture was added to Petri dishes along with the suspension of urediniospores. The experimental

¹ Associação Riograndense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural- EMATER/RS, Associação Sulina de Crédito e Assistência Rural - ASCAR, Rua Botafogo, 1051, CEP 90150-053, Porto Alegre, RS. Email: rrsabatino@gmail.com. *Autora para correspondência.

² Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV/ UDESC, Av. Luiz Camões, 2090, Bairro: Conta Dinheiro, CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP. Rua José Barbosa de Barros, 1780, CEP 13610-307, Botucatu, SP, Brasil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal - CAV/UDESC.

⁵ Los Grobo Ceagro do Brasil S/A. Av. Governador Luiz Rocha, 900, Parque Cidade Maravilha, CEP 65800-000, Balsas, MA, Brasil.

design was completely randomized with four replications. Under the optical microscope 100 urediniospores per Petri dish were analyzed. Data was statistically analyzed by regression. All fungicides from the strobilurin chemical group (azoxystrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin and trifloxystrobin) and tebuconazole showed highly toxicity to urediniospores of the *P. hemerocallidis*, and epoxiconazole and cyproconazole fungicides, such as the rock dust had moderately toxicity.

KEY WORDS: Daylily rust, fungicides, rock dust, inhibitory concentration.

INTRODUÇÃO

Na cultura do hemerocale a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia hemerocallidis* Thuem, é uma das doenças mais destrutivas (WILLIAMS-WOODWARD et al., 2001; HERNÁNDEZ et al., 2002; BUCK e WILLIAMS-WOODWARD, 2003; MUELLER et al., 2003; EPPO, 2009). Os sintomas e sinais da doença são caracterizados pelo surgimento de estrias, encharcamento, bronzeamento, pontos brilhantes (WILLIAMS-WOODWARD et al., 2001) e principalmente a formação de pequenas pústulas de coloração alaranjada visualizadas em folhas, hastes florais, botões e frutos (HERNÁNDEZ et al., 2002).

Conforme Mueller e Buck (2003), para que ocorra a infecção do fungo em plantas de hemerocale são necessárias temperaturas próximas de 22°C e 100% de umidade relativa do ar no local de infecção, por aproximadamente 5 horas. Abaixo de 10°C há redução significativa no desenvolvimento da doença, e acima de 36°C o desenvolvimento da mesma é interrompido.

Segundo Eppo (2009), a melhor estratégia para o controle da ferrugem do hemerocale é a exclusão da doença, no entanto, em locais onde a doença já se encontra estabelecida, o uso de cultivares resistentes e a aplicação de fungicidas são os métodos a serem empregados.

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos *in vitro*, com o objetivo de verificar a

fungitoxicidade de compostos químicos, os quais podem gerar resultados semelhantes aos obtidos a campo ou em casa de vegetação. Isso se deve à rapidez com que os resultados são obtidos e ao menor gasto de tempo e de material na condução deste tipo de experimento (BLUM, 2009).

A fungitoxicidade de um fungicida é a capacidade que este possui de ser tóxico aos fungos em baixas concentrações. No entanto, esta capacidade é dependente das características genéticas e fisiológicas de cada fungo, pois um fungicida pode apresentar toxidez a uma espécie e não a outra. Além disso, um fungicida pode ser tóxico a um determinado fungo e depois de algum tempo pode deixar de ser devido ao surgimento de resistência por parte do patógeno (REIS et al., 2010).

Uma das maneiras de se quantificar a fungitoxicidade é por meio do conhecimento da concentração do composto químico capaz de inibir em 50% (CI₅₀) a germinação de esporos do fungo. Esta concentração é expressa em mg.L⁻¹ e refere-se ao ingrediente ativo do mesmo. Desta forma, compostos químicos que apresentam baixos valores de CI₅₀ indicam alta fungitoxicidade. Outra forma utilizada para verificar o poder fungitóxico de um composto químico, é a determinação da CI₁₀₀, a qual se refere à concentração mínima capaz de inibir em 100% o crescimento visível do patógeno (REIS et al., 2010).

Edgington et al. (1971), avaliando a fungitoxicidade de benzimidazóis em diferentes grupos taxonômicos de fungos sugeriram três classificações dos compostos químicos quanto a sua fungitoxicidade. Compostos químicos altamente fungitóxicos são aqueles que apresentam DE₅₀ (dose efetiva) menor do que 1 mg.L⁻¹, moderadamente fungitóxicos aqueles que apresentam DE₅₀ entre 1 e 50 mg.L⁻¹ e não tóxicos aqueles que apresentam DE₅₀ maior do que 50 mg.L⁻¹.

No Brasil não se tem informação de estudos avaliando concentrações inibitórias de compostos químicos na redução da germinação de uredosporos de *P. hemerocallidis*. Este estudo

é de grande valia na seleção de fungicidas com potencial de controle da ferrugem e no monitoramento da sensibilidade do patógeno.

Desta forma, com o presente trabalho, objetivou-se determinar, *in vitro*, a concentração inibitória capaz de reduzir em 50% e 100% (CI_{50} e CI_{100}) a germinação de uredosporos de *P. hemerocallidis* em oito produtos separadamente. Dentre eles quatro fungicidas do grupo químico das estrobilurinas (azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina), três fungicidas do grupo químico dos triazóis (ciproconazol, epoxiconazol e tebuconazol) e pó de rocha (Rocksil).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em abril e maio de 2011, no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, situado no município de Lages, SC.

Avaliou-se a ação de quatro fungicidas do grupo químico das estrobilurinas: azoxistrobina (Priori 250 SC), picoxistrobina (Oranis 250 SC), piraclostrobina (Comet 250 CE) e trifloxistrobina (Flint 500 WG); três fungicidas do grupo químico dos triazóis: ciproconazol (Alto 100 CS), epoxiconazol (Opus 125 SC) e tebuconazol (Folicur 200 EC); e pó de rocha (Rocksil) nas concentrações de 0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mg.L⁻¹ obtidas por diluições sucessivas.

O meio de ágar-água foi preparado utilizando-se 1,5 g de ágar em 50 mL de água destilada, sendo este esterilizado em autoclave sob a temperatura de 120°C, durante 20 minutos. Após o resfriamento do meio à aproximadamente 45°C misturou-se a este os fungicidas e o pó de rocha diluídos em água estéril, nas respectivas concentrações. As misturas foram vertidas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro e armazenadas a temperatura de 4°C durante 24 horas (BUCK e WILLIAMS-WOODWARD, 2003; BLUM, 2009).

Decorrido o período estabelecido, adicionou-se em cada placa de Petri 0,5 mL

de uma suspensão contendo uredosporos de *P. hemerocallidis*, obtidos de folhas coletadas das cultivares de hemerocale Cora Offer, Daniela Esther Nass, Harriet, Margaret Mee e São Paulo. Folhas com pústulas esporuladas foram adicionadas em água destilada, em um erlenmeyer e agitadas para a remoção dos uredosporos com posterior filtragem da solução em camada de gaze. A concentração de uredosporos na solução foi mensurada em câmara de Neubauer obtendo-se na média de dez amostras, 99.000 uredosporos. mL⁻¹.

Após a adição da suspensão de uredosporos as placas foram incubadas a temperatura de 22°C, no escuro, durante 6 horas (BUCK e WILLIAMS-WOODWARD, 2003; BLUM, 2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

Finalizado o período de incubação, em cada placa de Petri adicionou-se 0,3 mL de acetona (99,5%) contendo gotas de azul de algodão com o objetivo de inibir o desenvolvimento do tubo germinativo dos uredosporos e melhor visualização das estruturas ao microscópio. Após este procedimento, as placas foram mantidas a temperatura de aproximadamente 4°C até o momento da contagem dos esporos germinados (BUCK e WILLIAMS-WOODWARD, 2003; BLUM, 2009).

A germinação dos uredosporos foi observada em microscópio óptico, analisando em cada placa de Petri 100 uredosporos ao acaso e destes observou-se a quantidade de germinados. Consideraram-se esporos germinados aqueles que apresentaram o tubo germinativo maior ou igual ao diâmetro do esporo. A porcentagem de inibição da germinação de esporos em cada tratamento foi calculada a partir da porcentagem de germinação da sua respectiva testemunha.

Os dados foram submetidos a análise de regressão utilizando o programa estatístico WinStat, Versão 1.0.

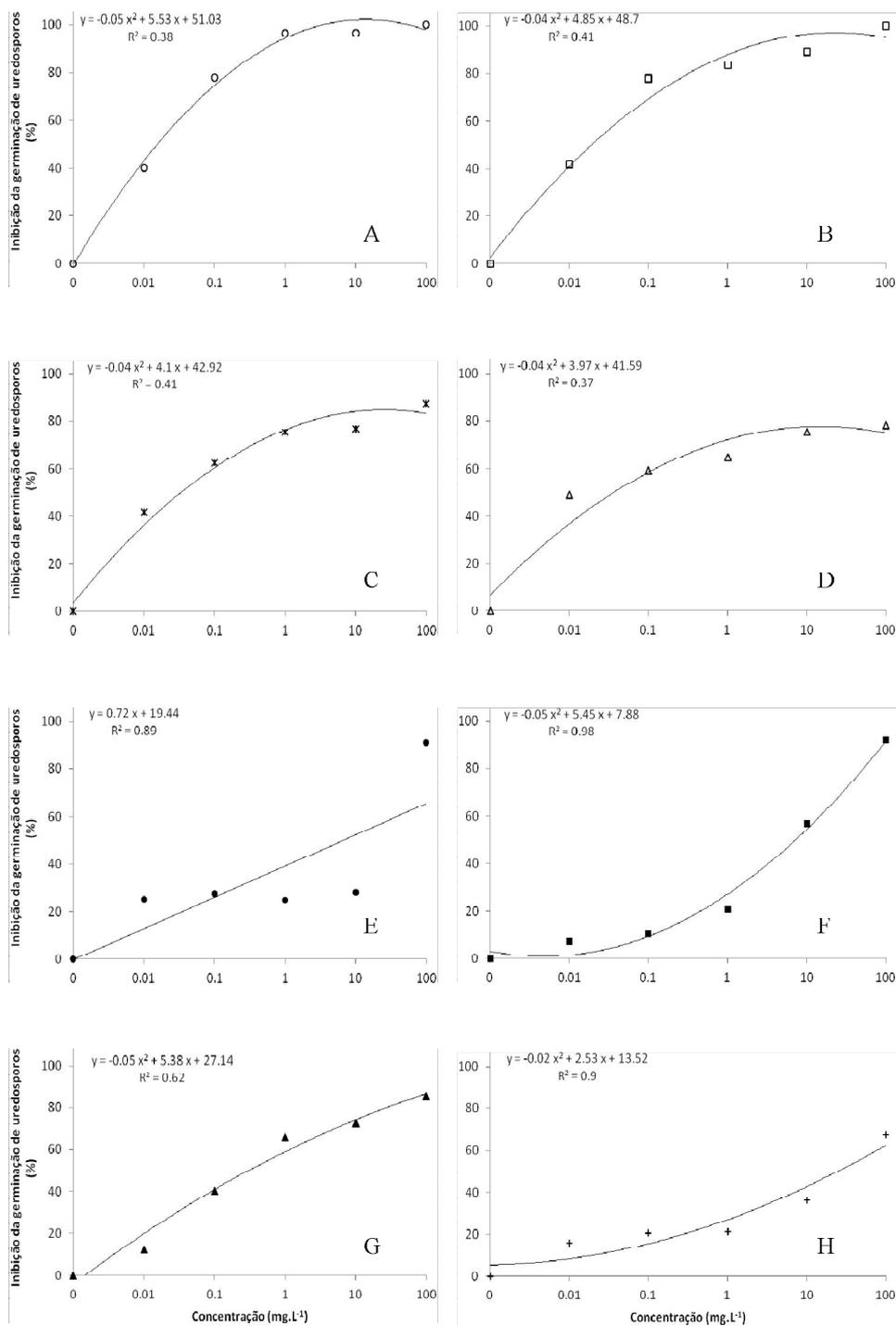


Figura 1 - Porcentagem de inibição da germinação de uredosporos de *Puccinia hemerocallidis* em meio de ágar-água contendo diferentes concentrações de azoxistrobina (A), picoxistrobina (B), piraclostrobina (C), trifloxistrobina (D), ciproconazol (E), epoconazol (F), tebuconazol (G) e pó de rocha (H). Lages, SC, 2012.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção do fungicida ciproconazol, o qual apresentou comportamento linear, todos os demais fungicidas e o pó de rocha apresentaram comportamento quadrático significativo (Figura 1).

Observou-se que as concentrações inibitórias para reduzir em 50% (CI_{50}) a germinação dos uredosporos de *P. hemerocallidis* ficaram num intervalo entre 0,01 e 0,1 mg.L⁻¹ para os fungicidas do grupo químico das estrobilurinas (azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina) (Figura 1). Estes resultados estão de acordo com os observados por Buck e Williams-Woodward (2003), os quais encontraram valores de CI_{50} entre 0 e 10 mg L⁻¹ para o fungicida azoxistrobina na inibição da germinação de uredosporos de *P. hememocallidis*, e de acordo com os observados por Blum (2009), a qual obteve valores estimados da CI_{50} entre 0,01 e 0,14 mg L⁻¹ para as mesmas estrobilurinas avaliadas no presente estudo, no entanto, verificando seus efeitos sobre a germinação de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd.

Considerando a classificação de fungitoxicidade proposta por Edgington et al. (1971), pode-se afirmar que todos os fungicidas do grupo químico das estrobilurinas avaliados neste trabalho são substâncias altamente fungitóxicas a *P. hemerocallidis*, pois apresentaram CI_{50} menor do que 1 mg L⁻¹.

Para os fungicidas do grupo químico dos triazóis as concentrações inibitórias (CI_{50}) ficaram num intervalo entre 0,1 e 1 mg.L⁻¹ para o tebuconazol; entre 1 e 10 mg.L⁻¹ para o epoxiconazol; e entre 10 e 100 mg. L⁻¹ para o ciproconazol (Figura 1). Seguindo a proposta de Edgington et al. (1971), tebuconazol é altamente fungitóxico e epoxiconazol é moderadamente fungitóxico. Apesar de ciproconazol apresentar o intervalo de CI_{50} que abrange duas classificações, ao substituir na respectiva equação de regressão o valor de $y=50$ (correspondendo a 50% de inibição da germinação de uredosporos) encontra-se a CI_{50} de 42,44, permitindo classificá-lo como

moderadamente fungitóxico a *P. hemerocallidis*.

Blum (2009), testando *in vitro*, os mesmos fungicidas triazóis avaliados neste trabalho, na inibição da germinação de uredosporos de *P. pachyrhizi* obteve valores estimados da CI_{50} de 0,005 a 0,008 mg.L⁻¹ para o tebuconazol; de 0,42 a 0,47 mg.L⁻¹ para o epoxiconazol; e de 2,91 a 3,10 mg.L⁻¹ para o ciproconazol. Observou-se que os valores obtidos neste trabalho estão acima dos observados por Blum (2009), indicando que os triazóis avaliados apresentam menor fungitoxicidade a *P. hemerocallidis* em comparação a *P. pachyrhizi*. Esse resultado ressalta a importância de se utilizar fungicidas com a eficácia comprovada no patógeno específico, pois a mesma substância pode apresentar diferentes níveis de fungitoxicidade dependendo da espécie do fungo (REIS et al., 2010).

Observou-se neste estudo, assim como também verificado por Blum (2009), maiores valores de CI_{50} para os fungicidas do grupo químico dos triazóis em relação ao das estrobilurinas. Esse resultado se deve a atuação dos fungicidas do primeiro grupo citado em processos posteriores ao da germinação permitindo neste caso, que o fungo utilize as suas reservas no processo de germinação (BUCK e WILLIAMS-WOODWARD, 2003; MUELLER et al., 2005; BLUM, 2009). Devido a esse comportamento, Reis et al. (2010) destacam a importância de se estudar a CI_{50} de fungicidas inibidores da biossíntese de esteróis *in vivo*. Apesar do exposto, fungicidas que atuam em um mesmo processo podem ser testados *in vitro* com o objetivo de serem comparados entre si.

Observou-se que para o pó de rocha a CI_{50} ficou num intervalo entre 10 e 100 mg.L⁻¹ (Figura 1). Seguindo a mesma classificação utilizada para os fungicidas, de Edgington et al. (1971), e substituindo o valor de $y=50$ na respectiva equação encontra-se a CI_{50} de 44,22, permitindo classificá-lo como substância moderadamente fungitóxica a *P. hemerocallidis*.

Segundo o fabricante do pó de rocha (Rocksil), o produto induz resistência na planta aos patógenos. No entanto, como verificado neste estudo este apresentou ação fungitóxica a

uredosporos de *P. hemerocallidis*, característica esta questionada entre os critérios para confirmar a capacidade de uma substância em induzir resistência na planta (CAVALCANTI et al., 2005; PASCHOLATI et al., 2008). Verginassi et al. (2011), trabalhando com silício também verificaram o efeito tóxico deste elemento a uredosporos de *P. pachyrhizi*, inibindo em até 100% a germinação do fungo, porém com dose de 500 mg.L⁻¹.

A concentração inibitória para reduzir em 100% (CI₁₀₀) a germinação de uredosporos de *P. hemerocallidis* foi verificada apenas para os fungicidas azoxistrobina e picoxistrobina. Em ambos, a CI₁₀₀ foi de 100 mg.L⁻¹, ou seja, a máxima concentração testada (Figura 1). Mueller et al. (2005), avaliando fungicidas, *in vitro*, na germinação de esporos de seis diferentes ferrugens em plantas ornamentais, incluindo *P. hemerocallidis*, verificaram menos de 1% de germinação de esporos durante ou após a exposição aos fungicidas azoxistrobina e trifloxistrobina.

CONCLUSÃO

Os fungicidas azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina e tebuconazol apresentaram elevada fungitoxicidade a uredosporos de *P. hemerocallidis*, e os fungicidas ciproconazol e epoxiconazol, bem como o pó de rocha apresentaram ação moderadamente fungitóxica ao patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUM, M. M. C. **Sensibilidade de *Pakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. 2009. 164p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

BUCK, J. W.; WILLIAMS-WOODWARD, J. L. The effect of fungicides on urediniospore germination and disease development of daylily rust. **Crop Protection**, New York, v.22, p.135-

140, 2003.

CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263p.

EDGINGTON, L. V. et al. Fungitoxic spectrum benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.61, p.42-44, 1971.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). *Puccinia hemerocallidis*. Paris: EPPO, 2009. p.48-50. Boletim, 39.

HERNÁNDEZ, J. R. et al. A. *Puccinia hemerocallidis*, cause of daylily rust, a newly introduced disease in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p.1194-1198, 2002.

MUELLER, D. S.; BUCK, J. W. Effect of light, temperature, and leaf wetness duration on daylily rust. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, p.442-445, 2003.

MUELLER, D. S. et al. Toxicity of fungicides to urediniospores of six rust fungi that occur on ornamental crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p.255-261, 2005.

MUELLER, D. S. et al. Resistance of daylily cultivars to the daylily rust pathogen, *Puccinia hemerocallidis*. **HortScience**, Alexandria, v.38, p.1137-1140, 2003.

PASCHOLATI, S. F. et al. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 627p.

REIS, E. M. et al. **Manual de fungicidas: guia para controle químico de doenças de plantas**. 6 ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2010. 226p.

VERGINASSI, A. et al. Efeito *in vitro* de caldas alternativas e silício na germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, n. 36, p. 649, 2011.

WILLIAMS-WOODWARD, J. L. et al. First report of daylily rust in the United States. **American Phytopathological Society Plant Disease**, Saint Paul, v.85, p.1121, 2001.