

Sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da quinona oxidase

DA SILVA, H. P.¹; XAVIER, S. A.²; LOPES, I. O. N.³; GODOY, C. V.³

¹Centro Universitário Filadelfia; ²Universidade Estadual de Londrina; ³Embrapa Soja; helen_08.02@hotmail.com

Introdução

A soja, *Glycine max* (L.) Merr. é uma planta anual originária da China, sendo uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo (BORÉM, 1999). A expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional, sendo favorecida pela sua adaptação as diferentes regiões edafoclimáticas, alta produtividade, facilidade de manejo, condições favoráveis ao cultivo e facilidade de mecanização. A área semeada no Brasil em 2014/2015 foi de 31.504,2 mil ha, com a produção estimada em 94.280,5 mil toneladas (CONAB, 2015). Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja, encontram-se as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil (TECNOLOGIAS..., 2011).

A ferrugem-asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., é uma das principais doenças da cultura, com danos variando de 10% a 90% nas diversas regiões geográficas onde foi relatada (SINCLAIR; HARTMAN, 1999). Os sintomas iniciais da doença são pequenas lesões foliares, de coloração castanha a marrom-escura. Na face inferior da folha, pode-se observar urédias que se rompem e liberam os uredosporos. Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, que compromete a formação, o enchimento de vagens e o peso final do grão. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho do grão e, conseqüentemente, maior a perda de rendimento e de qualidade (SINCLAIR; HARTMAN, 1999).

Para reduzir os riscos de danos à cultura pela ferrugem-asiática, no Brasil, as estratégias recomendadas no manejo da doença são: a utilização de cultivares de ciclo precoce, com semeadura no início da época recomendada; a ausência de cultivos de soja na entressafra, incluindo a eliminação de plantas de soja voluntárias, por meio do vazio sanitário; o monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura, com a utilização de fungicida no aparecimento dos primeiros sintomas ou, preventivamente, quando a doença já estiver presente na região e a utilização de cultivares resistentes, quando disponíveis (TECNOLOGIAS..., 2011).

Os fungicidas sítio-específicos representam uma das principais estratégias de controle da ferrugem, porém, uma redução na eficiência vem sendo observada para vários fungicidas. Para os fungicidas Inibidores da Desmetilação (DMIs) uma queda na eficiência de controle foi observada na região dos Cerrados em 2007/08 e, em 2008/09, na região Sul do Brasil, em decorrência da seleção de isolados do fungo menos sensíveis a esse grupo (SCHMITZ et al., 2014). Fungicidas Inibidores da Quinona oxidase (Qol) apresentavam menor eficiência quando comparados a DMIs, no entanto, uma redução de eficiência foi observada nos ensaios realizados em 2013/14 também para esse grupo (GODOY et al., 2014), podendo estar relacionada a seleção de isolados menos sensíveis/resistentes a esse modo de ação.

Para verificar mudanças de sensibilidade do patógeno é necessário o monitoramento do fungo por meio de bioensaios. Para Qols, a metodologia recomendada pelo FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) para *P. pachyrhizi* é a inibição da germinação de esporos, in vitro, em meio de cultura com fungicida (FRAC, 2006). Esse método tem sido utilizado para determinação da DL50 (dose letal do fungicida para controlar 50% da população). Valores de DL50 variando de 0,14 mg L⁻¹ a 2,47 mg L⁻¹ para azoxistrobina (média: 0,41 mg L⁻¹) e de 0,43 mg L⁻¹ a 1,53 mg L⁻¹ para piraclostrobinina (média: 0,95 mg L⁻¹), respectivamente, foram obtidos por Schmitz et al. (2014) utilizando a metodologia de inoculação em folhas destacadas, com isolados de *P. pachyrhizi* do Brasil coletados em 2010.

Valores da DL₅₀, para *P. pachyrhizi* ao longo dos anos são escassos na literatura, porém necessários para o monitoramento da variação da sensibilidade do fungo aos fungicidas, principalmente em razão da intensa utilização de fungicidas na cultura.

O objetivo do trabalho foi determinar a DL₅₀ dos fungicidas azoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobinina (Qols), para populações do fungo *P. pachyrhizi* coletados em diferentes regiões produtoras de soja do Paraná, na safra 2014/15.

Materiais e métodos

Foram conduzidos ensaios in vitro, no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja, no ano de 2015, utilizando a metodologia de germinação de esporos de *P. pachyrhizi* em meio de cultura (FRAC, 2006). O inóculo de *P. pachyrhizi* foi proveniente de amostras de folhas infectadas, coletadas em casa-de-vegetação ou lavouras do Paraná (Tabela 1). Foi recebido um número maior de amostras, porém, em razão de terem sido coletadas em lavouras comerciais com fungicida, apresentaram baixa germinação de esporos, impossibilitando sua utilização.

Formulações comerciais de Priori®, Syngenta (azoxistrobina 25%); Comet®, BASF (piraclostrobina 25%) e Oranis®, DuPont

(picoxistrobina 25%) foram usadas nos experimentos. Os fungicidas foram previamente diluídos em solução estoque com água estéril na concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de diluições seriadas em água para obter as concentrações finais. As diferentes concentrações dos fungicidas foram incorporadas ao meio ágar-água fundente e vertidos 20 mL em placas de Petri de 7 cm de diâmetro (esterilizadas e descartáveis) e as placas colocadas para resfriamento por 24 horas, em temperatura ambiente. A concentração final avaliada foi zero; 0,03125; 0,06250; 0,125; 0,25; 0,5; 0,1; 1 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Uredosporos de *P. pachyrhizi* foram removidos dos folíolos de soja infectados por meio de aspiração com bomba de vácuo e colocados em 20 mL de água destilada e 0,5 mL de álcool 70%. O álcool foi utilizado para quebrar a tensão superficial e desagregar os esporos. Um ensaio prévio foi realizado para definir a concentração de álcool que não inibisse a germinação dos esporos. Uma suspensão de 1,5 mL de uredosporos foi depositada por placa. As placas foram incubadas em BOD (câmara de germinação) a $23 \text{ }^{\circ}\text{C} + 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período mínimo de quatro horas. Foram realizadas quatro repetições por concentração.

A germinação dos esporos foi quantificada em microscópio óptico (10X), sendo considerado germinado o esporo com tubo germinativo maior que o comprimento do esporo. Foram observados 50 esporos por placa.

A porcentagem de controle de cada fungicida foi calculada conforme a equação, $PC = 100(1 - X_{ij}) / X_{\text{max}}(\text{test})$, onde PC é a porcentagem de controle, X_{ij} é a germinação observada na concentração i da repetição j , $X_{\text{max}}(\text{test})$ é a germinação máxima observada no tratamento testemunha. Os dados foram linearizados pela função logaritmo da porcentagem de controle, na base 10. As estimativas das doses letais (DL_{50}) foram obtidas pelo modelo de regressão probit Proc Probit, do sistema SAS® Versão 9.1.3.

Resultados e discussão

Todos os valores de DL_{50} estimados foram abaixo de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, independente do produto, local e data de coleta. Os valores de DL_{50} variaram de $0,012 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ para piraclostrobina (média: $0,21 \mu\text{g mL}^{-1}$), $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ para picoxistrobina (média: $0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$) e $0,0066 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxistrobina (média: $0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 1). Não foi observado um padrão entre os valores para os diferentes produtos. Em Londrina, PR (amostra 4), Cruzmaltina, PR (amostra 12) e Ubiratã, PR (amostra 14) os maiores valores de DL_{50} foram observados para piraclostrobina. Já em Campo Mourão, PR (amostra 6), Luziânia, PR (amostra 8), Londrina, PR (amostra 12) e Mauá da Serra, PR (amostra 13) as maiores DL_{50} foram observadas para azoxistrobina.

Mesmo com diferente metodologia, os valores obtidos por Schmitz et al. (2014) para piraclostrobina e azoxistrobina em 2010, foram semelhantes aos obtidos nesse estudo e abaixo de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os baixos valores de DL_{50} não explicam a queda de eficiência observada no campo para os Qols. Os esporos para o ensaio com a amostra de Londrina, PR (amostra 10), foram coletados dentro de uma parcela onde havia sido aplicado azoxistrobina, e apresentava baixa eficiência de controle. Também não foi observada nenhuma tendência de aumento de valores de DL_{50} ao longo da safra, com valores baixos mesmo em amostras coletadas em soja safrinha em Ubiratã, PR (amostras 14 e 15).

Conclusão

Os valores de DL_{50} obtidos para piraclostrobina, picoxistrobina e azoxistrobina foram abaixo de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, com médias semelhantes para os três produtos. Ensaio adicionais serão conduzidos com populações com valores extremos para verificar a correlação dos valores de DL_{50} com a eficiência no campo.

Referências

BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 10, p. 101-107, 1999.

CONAB. 7º **Levantamento** - Safra 2014/15. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

FRAC. PHAKPA in vitro method Syngenta 2006 V1. 2006. Disponível em: <<http://www.frac.info/monitoring-method>>. Acesso: em 20 abr. 2015.

GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M.; MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; PIMENTA, C.B.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D.S.; BORGES, E.P.; ANDRADE JUNIOR, E.R.; SIQUERI, F.V.; JULIATTI, F.C.; GRIGOLLI, J.F.J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L.C.; SILVA, L.H.C.P.; SATO, L.N.; CANTERI, M.G.; MADALOSSO, M.; ITO, M.A.; MARTINS, M.C.; BALARDIN, R.S.; FURLAN, S.F.; MONTECELLI, T.D.N.; CARLIN, V.J.; BARROS, V.L.N.; VENANCIO, W.S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2013/14: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 8p. (Embrapa Soja, Circular Técnica 103).

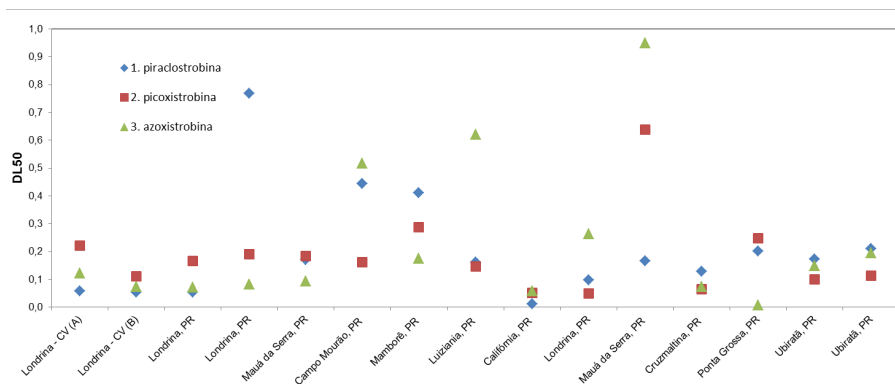
SCHMITZ, H.K.; MEDEIROS, C.A.; CRAIG, I.R.; STAMMLER, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, v. 70, n. 3, p. 378–388, 2014.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Eds.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. Saint Paul: APS Press, 1999. p. 25-26.

TECNOLOGIAS de produção de soja: região central do Brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 261p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 15).

Tabela 1. Locais e data de coleta das amostras avaliadas.

Local	Data de coleta
1 Londrina – casa de vegetação (A)	28/01/2015
2 Londrina – casa de vegetação (B)	02/02/2015
3 Londrina, PR	17/02/2015
4 Londrina, PR	25/02/2015
5 Mauá da Serra, PR	27/02/2015
6 Campo Mourão, PR	05/03/2015
7 Mamborê, PR	05/03/2015
8 Luiziania, PR	06/03/2015
9 California, PR	12/03/2015
10 Londrina, PR – Campo Embrapa Soja	17/03/2015
11 Mauá da Serra, PR - Sementes Mauá	20/03/2015
12 Cruzmaltina, PR	24/03/2015
13 Ponta Grossa, PR	26/03/2015
14 Ubatatã, PR	15/04/2015
15 Ubatatã, PR	24/04/2015

**Figura 1.** Valores de DL₅₀ de *Phakopsora pachyrhizi* para os fungicidas piraclostrobina, picoxistrobina e azoxistrobina, em diferentes locais, na safra 2014/15.