AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Exserohilum turcicum* A FUNGICIDAS SISTÊMICOS

Bárbara Maria Lustri[1]; Natalia Caetano Vasques[2]; Marcelo Teixeira Silva[3]; Cleiltan Novais da Silva[4]; Francielli Gasparotto[5]

[1]Acadêmica do Curso de Agronomia, Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. Bolsista PIC-UNICESUMAR.
barbara_gaiotti@hotmail.com
[2]Acadêmica do Curso de Agronomia, Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. Bolsista PIC-UNICESUMAR.
natalia.caetanovasques@hotmail.com
[3]Mestre em Tecnologias Limpas do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR.
teixeirasilvamarcelo82@gmail.com
[4]Pós-doutoranda do Programa de Mestrado em Tecnologias Limpas e do Curso de Agronomia, Centro Universitário Maringá - UNICESUMAR, Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI.
cleiltan@gmail.com
[5]Orientadora, Profa. Dra do Programa de Mestrado em Tecnologias Limpas e do Curso de Agronomia, Centro Universitário Maringá - UNICESUMAR, Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI.
francielli.gasparotto@unicesumar.edu.br

RESUMO

O uso intensivo e sem critérios técnicos de fungicidas sistêmicos no combate de doenças na cultura do milho pode selecionar populações resistentes de patógenos, tornando o controle mais difícil e aumentando as perdas na cultura. Entre esses patógenos, pode estar o fungo *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose, doença que causa redução no índice de área foliar verde, interceptando a radiação, tornando os fotoassimilados insuficientes para o preenchimento dos grãos. Assim, objetivou-se avaliar a sensibilidade do agente causal da helmintosporiose ao fungicida sistêmico tebuconazol. Foram obtidos seis isolados do patógeno (A1, A2, A3, A4, A5 E A6) a partir de plantas de milho sintomáticas na região de Maringá e em seguida, foram realizados bioensaios para avaliar a sensibilidade do crescimento micelial de *Exserohilum turcicum* ao fungicida selecionado, nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 ppm. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Para quantificação do crescimento micelial, foram feitas medições perpendiculares das colônias fúngicas em cada tratamento. Os dados foram submetidos a uma análise de regressão, obtendo-se o ED50 (concentração do ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial do isolado). Verificou-se que o fungicida testado apresentou alta fungitoxidade aos isolados A1 e A3, sendo estes os isolados mais sensíveis ao mesmo. Os demais isolados apresentaram-se medianamente sensíveis ao tebuconazol, sendo o fungicida considerado com média fungitoxidade a estes (A2, A4, A5 e A6). Assim, pode-se concluir que os isolados avaliados apresentaram variabilidade quanto a sensibilidade ao fungicida tebuconazol, porém todos foram sensíveis a este.

PALAVRAS-CHAVE: helmintosporiose; controle químico; resistência.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos grãos alimentares mais antigos sendo considerado como uma das três principais culturas de cereais no mundo, juntamente com o arroz e o trigo (ROSSI et al., 2015). Esta gramínea apresenta importância tanto para alimentação humana, através da industrialização e consumo *in natura*, como para animais, na silagem (CAMERA; DEUNER, 2017). Segundo a Conab (2019) a produção da safra 2018/2019, foi de aproximadamente 98 milhões de toneladas do grão, tornando o Brasil o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas da China com 257 milhões e Estados Unidos, 366,6 milhões de toneladas do grão (USDA, 2018).

Associado ao aumento do cultivo de milho no Brasil, também se observou um aumento significativo na incidência de doenças nesta cultura, fato que contribuiu para perdas de produtividade nas principais regiões produtoras do país (JULIATTI et al.,

2007). Provavelmente, este aumento se deve a expansão da área de cultivo com o plantio direto (REIS et al., 2004), de modo que resíduos culturais no solo favorecem a sobrevivência dos fitopatógenos e o aumento de inóculo na área, ou até mesmo o reaparecimento de sintomas já relatados e/ou novos (CASA et al., 2006).

Neste contexto, as doenças foliares que antes apresentavam baixa incidência, com o passar dos anos estão provocando maiores danos (COTA, 2014). Dentre as principais doenças fúngicas foliares associadas à cultura do milho no Brasil, destacam-se a mancha-branca (*Phaeosphaeria maydis*), Helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), mancha de macrospora (*Stenocarpella macrospora*) e a cercosporiose causada por *Cercospora zeae-maydis* (MANFROI et al., 2016), além da ferrugem polissora, cujo agente causal é *Puccinia polysora*, sendo uma das mais relevantes doenças do milho no País (COLOMBO et al., 2014).

Destacam-se como as principais estratégias de manejo para o controle de doenças na cultura do milho, o uso de variedades resistentes, rotação de culturas, eliminação de plantas infestantes e controle químico, através dos fungicidas (CASSETARI NETO, 2007).

De acordo Uebel (2015) são muitos os produtos fungitóxicos registrados para o controle de enfermidades na cultura do milho no Brasil. Segundo o mesmo autor é imprescindível fazer o bom uso dessa ferramenta, já que o uso indiscriminado e sem critérios técnicos, como escolha correta do produto, momento e dose de aplicação, podem levar a problemas de falha de controle e favorecer a resistência de patógenos aos produtos químicos.

Um exemplo atual de resistência de patógenos se enquadra a ferrugem asiática na cultura da soja, que de acordo com Carvalho (2010), o uso sucessivo dos produtos fungicidas com mesmo princípio ativo safra após safra, aumento no número de aplicações, a seleção de populações de patógenos resistentes, acarretou em uma redução da eficiência de controle e uma elevação nos custos de produção.

Da mesma forma que encontramos estudos relacionados à resistência de doenças na cultura da soja, se torna de suma importância conhecer também as reduções de eficiência de controle das doenças na cultura no milho. O fungo *Exserohilum turcicum*, causador na helmintosporiose é um dos patógenos mais importantes que afetam o milho e representa uma grande ameaça ao cultivo da cultura em todo o mundo (ALTAF et al., 2016). Em condições adequadas, este fungo reduz drasticamente a produtividade das culturas, com perdas que podem chegar a 70 %, devido ao desfolhamento extensivo durante o período de enchimento dos grãos (FERNANDES et al., 2002). No Brasil, este agente causal ocorre em todas as regiões produtoras, principalmente na região Sul e nas chapadas na região Centro-Oeste (PEREIRA, 1995). O controle é feito, principalmente, por meio do uso de cultivares resistentes e fungicidas específicos no controle químico (PINTO, 2004).

Assim como para a ferrugem, o controle da helmintosporiose também se baseia no controle químico, sendo que de acordo com Guini e Kimati (2000) o uso frequente de fungicidas leva a uma pressão de seleção que ocasiona problemas como a sensibilidade dos agentes causais aos fungicidas. Quando alguns fungos se sentem ameaçados estes ativam dispositivos de variabilidade ligada à mutação ou reprodução sexual, por exemplo, para expressão de genes que ativem a insensibilidade ou resistência a fungicidas (LOPES et al., 2015).

Pesquisadores tem se referido ao fenômeno da resistência como uma perda da sensibilidade dos fungos aos produtos, resultando em uma diminuição da eficiência destes sob condições de campo (GUINI; KIMATI, 2000). Desta forma, mostra-se

essencial para um manejo eficiente da cultura do milho o desenvolvimento de estudos que avaliem a sensibilidade do fungo *Exserohilum turcicum* as moléculas fungicidas utilizadas em seu cultivo. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a sensibilidade do agente causal da helmintosporiose ao fungicida sistêmico tebuconazol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar a sensibilidade de *Exserohilum turcicum* a fungicidas, foram realizados testes in vitro, conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Unicesumar. Inicialmente foi realizado um levantamento de dados sobre os fungicidas utilizados na cultura do milho na região de Maringá, este ocorreu junto às cooperativas Cocamar, Integrada, Cocari e com os responsáveis das áreas onde as amostras de plantas sintomáticas foram coletadas. De acordo com este, verificou-se que a maioria dos fungicidas utilizados na cultura do milho na safra 2019 na referida região, são sistêmicos e pertencentes aos grupos químicos triazol e estrubilurina, isolados ou em mistura. Desse modo, foi selecionado para os testes o fungicida tebuconazol (200g/L), para a condução dos bioensaios.

Os isolados do patógeno *E. turcicum* ocorreram a partir de plantas com sintomas típicos da doença, provenientes de três propriedades localizadas no município de Maringá – Paraná. As plantas foram coletadas de acordo com a sintomatologia padrão da helmintosporiose em campo e levadas ao laboratório, onde então foi realizado o isolamento do agente causal em cultura pura por meio do método de isolamento indireto (tecido sintomático) como o descrito por Alfenas et al. (2007) e selecionadas seis amostras da área foliar, duas de cada propriedade, que foram repicadas e usadas na etapa seguinte.

Para avaliar a sensibilidade micelial do agente causal aos fungicidas, o bioensaio foi implantado mediante a incorporação do fungicida ao meio BDA (batata-dextrose-ágar) fundente, semelhante ao método descrito por Caldari Júnior (1998). O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos, constituídos pelo fungicida selecionado em 4 concentrações (1, 10, 50 e 100 ppm) e a testemunha (sem fungicida).

Após a preparação dos tratamentos uma amostra de cada isolado foi transferida para o centro da placa contendo o meio. O crescimento micelial do patógeno se deu aos 5 e 10 dias após a repicagem e foi realizado por meio da medida do diâmetro do crescimento micelial em dois sentidos perpendiculares entre si. Os dados foram submetidos a uma análise de regressão, obtendo-se o ED50 (concentração do ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial do isolado) e a concentração mínima inibitória (CMI) dos fungicidas.

O fungicida foi classificado em quatro categorias de fungitoxidade e sensibilidade in vitro, de acordo com a escala de Edgington et al. (1971) adaptada, em que: i) ED50 < 1 ppm: alta fungitoxidade (AE) e alta sensibilidade (AS); ii) ED50 1 - 10 ppm: modera fungitoxidade (ME) e modera sensibilidade (MS); iii) ED50 10 - 50 ppm: baixa fungitoxidade (BE) e baixa sensibilidade (BS); iv) ED50 > 50 ppm: não fungitóxico (I) e insensibilidade (IS).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os isolados de *E. turcicum* foram obtidos de plantas sintomáticas de milho com lesões necróticas, elípticas nas folhas, variando de 2,5 a 15 cm de comprimento, semelhante ao descrito por Camargo et al. (2005) Os resultados da inibição do

crescimento micelial dos isolados do patógeno, indicaram que houveram diferenças na eficiência do fungicida entre os diferentes isolados e a testemunha. De forma geral, as maiores dosagens do fungicida promoveram menores crescimentos miceliais, isto é, inibiram o desenvolvimento do patógeno, diferindo da testemunha sem uso de fungicida nas placas que apresentou o maior crescimento micelial tanto aos cinco dias (Figura 1) quanto aos dez dias (Figura 2).

Ocorreu uma variação neste padrão para os isolados A1 e A6, sendo que A1 apresentou maior diâmetro médio de colônia na dose de 10 ppm em relação a de 1 ppm na primeira avaliação. E para o isolado A6 verificou-se maior diâmetro de colônia na dose 50 ppm em relação a de 10 ppm em ambas as avaliações, porém ressalta-se que na maior dose testada não houve crescimento micelial de nenhum dos isolados avaliados (Figuras 1 e 2).

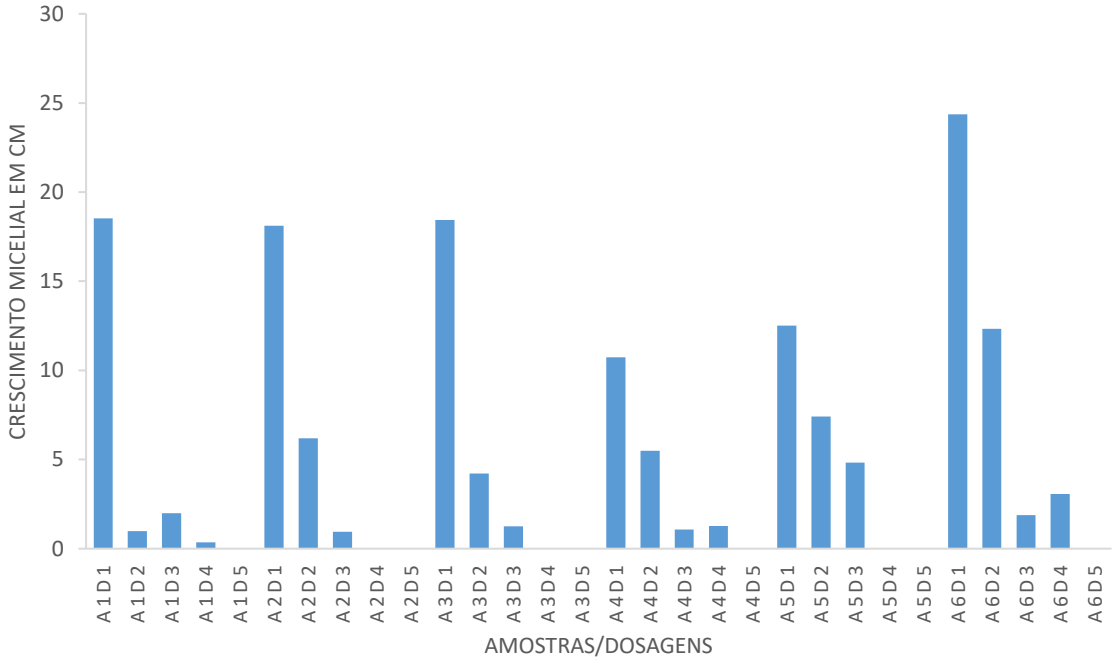

Figura 1. Crescimento micelial de isolados de *Exserohilum turcicum* em meio de cultivo contendo o fungicida tebuconazol em diferentes concentrações aos cinco dias após a repicagem fúngica
*Isolados A1, A2, A3, A4, A5 e A6 e tratamentos: D1 - testemunha, D2 - 1 ppm, D3 - 10 ppm, D4 - 50 ppm e D5 - 100 ppm's
Fonte: Dados da pesquisa

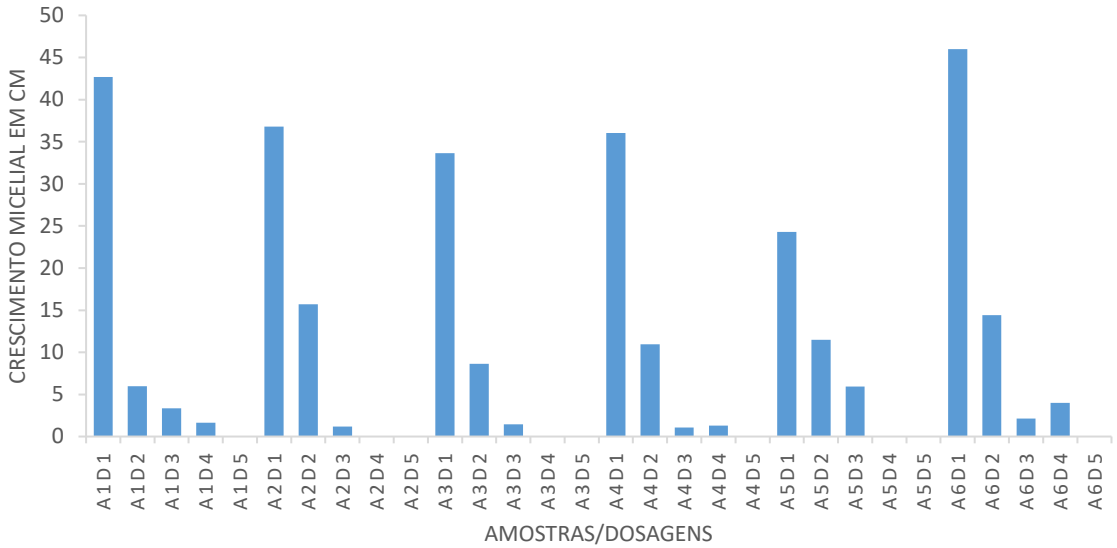

Figura 2: Crescimento micelial de isolados de *Exserohilum turcicum* em meio de cultivo contendo o fungicida tebuconazol em diferentes concentrações aos dez dias após a repicagem fúngica
*Isolados A1, A2, A3, A4, A5 e A6 e tratamentos: D1 - testemunha, D2 - 1 ppm, D3 - 10 ppm, D4 - 50 ppm e D5 - 100 ppm's
Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com os cálculos de regressão linear para obtenção da ED_{50}, verificou-se que o fungicida testado apresentou alta fungitoxidade aos isolados A1 e A3, sendo estes os isolados mais sensíveis ao mesmo. Os demais isolados apresentaram-se medianamente sensíveis ao tebuconazol, sendo o fungicida considerado com média fungitoxidade a estes isolados (A2, A4, A5 e A6) (Tabela 01).

Tabela 01. Dose efetiva mediana (ED_{50}) do fungicida tebuconazol (200g/L) sobre isolados de *Exserohilum turcicum* e suas respectivas classificações de acordo com o fenótipo do isolado e a fungitoxidade do princípio ativo.

Isolado	ED50[1]	Fenótipo[2]	Fungitoxidade[2]
1	0,73	AS	AE
2	1,19	MS	ME
3	0,95	AS	AE
4	1,95	MS	ME
5	3,15	MS	ME
6	1,84	MS	ME

[1]ED_{50} - quantidade do fungicida capaz de inibir 50% do crescimento micelial do isolado em placas de Petri; [2]Classificação de sensibilidade e fungitoxidade: < 1 ppm: alta fungitoxidade (AE) e alta sensibilidade (AS) ii) ED_{50} 1 - 10 ppm: modera fungitoxidade (ME) e moderada sensibilidade (MS) iii) ED_{50} 10 - 50 ppm: baixa fungitoxidade (BE) e baixa sensibilidade (BS) iv) ED_{50} > 50 ppm: não fungitóxico (I) e insensibilidade (IS)
Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com estes resultados verifica-se que não foram encontrados isolados resistentes/insensíveis ao tebuconazol e ressalta-se que o mesmo possui

registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a utilização na cultura do milho para controle da helmintosporiose. Estes resultados servem de suporte aos técnicos e produtores na tomada de decisão sobre qual o fungicida utilizar na cultura do milho para controle da referida doença.

A eficiência do tebuconazol em outras culturas também foi relatada, como no trabalho realizado por Pinto (2004) que verificou que o fungicida tebuconazol foi altamente eficiente no controle da helmintosporiose na cultura do sorgo, já Duarte et al. (2009) afirmoaram a ocorrência de efeitos positivos no controle da ferrugem comum, mancha branca e mancha de estenocarpela, pela utilização de tebuconazol tanto em mistura quanto puro, gerando na cultura do milho maiores porcentagem de área verde e acréscimo na produtividade.

4 CONCLUSÃO

O princípio ativo tebuconazol apresentou alta fungitoxidade aos isolados A1 e A3 e média fungitoxidade aos isolado A2, A4, A5 e A6.

De forma geral, o crescimento dos isolados avaliados foi inversamente proporcional a dose do fungicida utilizado, isto é, quanto maior a dose menor o crescimento micelial.

Os isolados avaliados apresentaram variabilidade quanto a sensibilidade a molécula fungicida utilizada, porém todos foram sensíveis ao princípio ativo tebuconazol.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, ACELINO COUTO et al. **Métodos em fitopatologia**. UFV, 2007.

ALTAF, M.; RAZIQ, F.; KHAN, I.; HUSSAIN, H.; SHAH, B.; ULLAH, W.; NAEEM, A.; ADNAN, M.; JUNAID, K.; SHAH S.R.A; ATTAULLAH, M.I. (2016). **Study on the response of different maize cultivars to various inoculum levels of *Bipolaris maydis* (Y. Nisik & C. Miyake) shoemaker under field conditions**. Journal of Entomology and Zoology Studies, 4, 533-537.

CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CAMERA, J.N.; DEUNER, C.C. **Thermal thresholds for the germination of conidia of *Exserohilum turcicum***. Rev. Ceres [online]. 2017, vol.64, n.2, pp.138-142.

CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. **São Paulo: Agronômica Ceres**, v. 2, 2005.

CARVALHO, E.A. **Indutores de resistência no manejo da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyshizi* Sydow & P. Sydow)**. 2010. 65f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 05, p. 427-439, 2006.

CASSETARI NETO, D.C. **Milho caderno técnico cultivas**, n.100, set.; 2007.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos soja 2018/2019 odécimo levantamento julho/2019.** Brasília: CONAB, 2019.

COLOMBO, G. A.; VAZ-DE-MELO, A.; TAUBINGER, M.; TAVARES, R. D. C.; SILVA, R. R. D. Análise dialélica para resistência a ferrugem polissora em milho em diferentes níveis de adubação fosfatada. **Bragantia,** v. 73, n. 1, p. 65-71, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/brag/2014nahead/aop_bragantia_afs0050.pdf. Acesso em: 15/05/2018.

COTA, L. V. Manejo integrado de doenças na cultura do milho. **Panorama Fitossanitário: cultura do milho.** 2014. Disponível em: http://panorama.cnpms.embrapa.br/controle. Acesso em: 15/05/2018.

DUARTE, R. P.; JULIATTI, F. C.; DE FREITAS, P. T. Eficácia de diferentes fungicidas na cultura do milho. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 4, 2009.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

FERNANDES, M.C.A.; BALMER, E. Variabilidade de isolados de *Exserohilum turcicum* em cultivares de milho (*Zea mays*) **Revista Universidade Rural**. Série Ciências da Vida c.22, n.1, p 1-5, 2002.

JULIATTI, F.C. et al. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grão ardidos. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 02, p. 34-41, 2007.

LOPES, L.N.S.; SILVA, A.S.; PEREIRA, C.C.O.; MENEZES, I.P.P.; MALAFAIA, G.; LIMA, M.L.P. Sensibilidade de isolados de Colletotrichum gloesporioides a fungicidas. **Muilti-Science Journal**, v.1, n.1, p. 106-114, 2015.

MANFROI, E.; LANGHINOTTI, C.; DANELLI, A.; PARIZE, G. Controle químico de doenças foliares e rendimento de grãos na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.15, n.2, p.357-365, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v15n2p357-365. Acesso em: 15/05/2018.

PEREIRA, O.A.P. Análise da situação atual de doenças do milho no Brasil e disponibilidade de germoplasma resistente. **Summa Phytopathologica** v.21, n.1, p. 67-79, 1995.

PINTO, N.F.A. Controle químico de doenças foliares do milho, **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.1, p. 134-138, 2004.

PINTO, NFJ de A. Controle químico da Helmintosporiose (Exserohilum turcicum). In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 1., 2004,

Cuiabá, MT. Da agricultura familiar ao agronegócio: tecnologia, competitividade e sustentabilidade: [resumos expandidos]. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo; Cuiabá: Empaer, 2004., 2004.

REIS, R.M.; CASA, R.T.; BRESOLIN, A.C.R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2 ed. Lages, SC: Graphel. 2004.

ROSSI, R.L.; REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R. (2015). **Conidial morphology and pathogenicity of *Exserohilum turcicum* isolates of corn from Argentina and Brazil**. Summa Phytopathol. 41(1):58-63.

UEBEL, J.D. **Avaliação de fungicidas no controle de doenças foliares, grãos ardidos e efeito no NDVI (Índice de Vegetação por Diferença Normalizada) em híbridos de milho**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

UNITED STATES OF AMERICA. United States Department Of Agriculture. **World agricultural production**. Washington, DC: USDA, 2018. Disponível em: <http://www.usda.gov.br>. Acesso em: 17/05/2018.