



LEANDRO ALVARENGA SANTOS

**RESISTÊNCIA DE *Cercospora coffeicola* A
FUNGICIDAS**

LAVRAS - MG

2015

LEANDRO ALVARENGA SANTOS

RESISTÊNCIA DE *Cercospora coffeicola* A FUNGICIDAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Fitopatologia, área de concentração em Controle Químico/Epidemiologia de doenças de plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Paulo Estevão de Souza

Coorientador

Dr. Edson Ampélio Pozza

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Santos, Leandro Alvarenga.

Resistência de *Cercospora coffeicola* a fungicidas / Leandro
Alvarenga Santos. Lavras: UFLA, 2015.
70 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.

Bibliografia.

1. Triazóis. 2. Estrobilurinas. 3. Casugamicina. 4. Controle Químico.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LEANDRO ALVARENGA SANTOS

RESISTÊNCIA DE *Cercospora coffeicola* A FUNGICIDAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Fitopatologia, área de concentração em Controle Químico/Epidemiologia de doenças de plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de janeiro de 2015.

Dra Cacilda Marcia Duarte Rios Faria UNICENTRO

Dr. Cesar Elias Botelho EPAMIG

Dr Eduardo Alves UFLA

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho UFLA

Dr. Paulo Estevão de Souza

Orientador

LAVRAS – MG

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família, por ser o alicerce necessário em minha vida. Meu pai, Gildo, pelo exemplo de ser humano; minha mãe, Marli, por me mostrar sempre o caminho mais humano a seguir e ao meu irmão, Guilherme, por me provar diariamente que família é sinônimo de amor incondicional. A minha avó Iranilda, *in memoriam*, por todos os sorrisos, alegrias e ensinamentos. Aos demais familiares, por todo apoio e confiança em mim depositados.

Aos meus orientadores, Paulo Estevão de Souza e Edson Ampélio Pozza, por acreditarem em mim desde o primeiro momento, pela amizade e ensinamentos. Ao professor Eduardo Alves, pelo exemplo de profissional. A Dra. Deila, sem a qual este projeto não seria possível, pela amizade e ajuda.

À Universidade Federal de Lavras, que me acolheu durante estes nove anos, lapidando-me como profissional e me forjando como homem. Será sempre um lugar especial nas minhas lembranças.

Ao Departamento de Fitopatologia, professores e funcionários, pela acolhida e os ensinamentos.

Aos órgãos de fomento, FAPEMIG, Capes e CNPq, pela bolsa de estudos e o suporte financeiro para a execução do projeto.

Aos amigos da “turma do veneno”, por fazerem do ambiente de pesquisa um local de amizade e companheirismo acima de tudo, por tornarem o cansativo trabalho diário um momento agradável e prazeroso. Sem vocês tudo seria mais difícil.

RESUMO

A cercosporiose do cafeeiro é uma das doenças mais importantes dessa cultura, entretanto, escassos são os trabalhos sobre o seu agente etiológico (*Cercospora coffeicola*) e o seu controle. Portanto, este trabalho foi realizado com os objetivos de desenvolver uma metodologia para isolamento do fungo *C. coffeicola*, verificar a existência de isolados do fungo com baixa sensibilidade/resistência aos principais fungicidas utilizados em campos comerciais, testar a eficiência de programas de pulverizações e verificar a influência do antibiótico casugamicina, amplamente utilizado para o controle da mancha-aureolada, sobre *C. coffeicola* e a sua influência na sensibilidade de fungicidas. Portanto, foi desenvolvida uma metodologia que permitiu o isolamento de cerca de 70 isolados do patógeno, utilizando uma nova técnica, denominada técnica da pipeta. Os testes com os programas de pulverizações demonstraram ineficiência de um dos programas (com duas aplicações de azoxistrobina e ciproconazol, em dezembro e em fevereiro, e a terceira aplicação com ciproconazol, em abril). No teste *in vitro*, o fungicida ciproconazol foi o único ingrediente ativo a apresentar algum grau de resistência para as variáveis IC₅₀, CIM e ICM. Por fim, foi possível concluir que a casugamicina tem moderada ação fungitóxica ao fungo *C. coffeicola*, embora sua utilização para este fim não seja regulamentada. Entretanto, sua utilização em campos comerciais deve ser evitada, visto que a exposição a ela confere diminuição da sensibilidade a fungicidas do grupo dos triazóis (DMIs).

Palavras-chave: Triazóis. Estrobilurinas. Casugamicina. Controle químico.

ABSTRACT

The coffee gray leaf spot of the most important diseases of the crop, but few published studies on the etiological agent (*Cercospora coffeicola*) and its control. Therefore the objectives of this study were to develop a methodology for isolating the fungus *C. coffeicola*, verify the existence of the isolates with low sensitivity / resistance to the main fungicides used in commercial fields, test the efficiency of spray programs and the influence of the antibiotic kasugamycin, widely used for control of bacterial blight on the *C. coffeicola* and its effect on the sensitivity of fungicides. Therefore, a method that allowed the isolation of 70 isolated from the pathogen was, developed; the new technique is called Pipette Technique. Tests with spraying programs showed inefficiency of the programs (with two applications of Azoxystrobin and Cyproconazole, December and February, and the third application with Cyproconazole April) and results '*in vitro*' Cyproconazole was the only active ingredient present some degree of resistance to the IC50 variables, CIM and ICM. Finally it was concluded that the Kasugamycin has moderate action fungitoxic the fungus *C. coffeicola*, although its use for this purpose is not regulated. However its use in commercial fields should be avoided because exposure to it confers reduced sensitivity to fungicides of the group of Triazoles (DMI's).

Keywords: Triazoles. Strobilurins. Kasugamycin. Chemical Control.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	8
1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Cafeeiro	10
2.2	<i>Cercospora coffeicola</i>	11
2.3	Isolamento de Fitopatôgenos	12
2.4	Controle Químico	13
2.5	Resistência de fungos a fungicidas	14
2.5.1	Monitoramento de sensibilidade	16
2.6	Influência da Casugamicina	17
2.7	Mecanismos moleculares de resistência	19
2.7.1	Inibidores da desmetilação (DMI's)	19
2.7.2	Fungicidas inibidores QO (QoI's)	20
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
	REFERÊNCIAS	23
	SEGUNDA PARTE	28
	ARTIGO 1 Nova técnica para isolar <i>Cercospora coffeicola</i> Berkeley & Cooke, agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro	28
	ARTIGO 2 Resistência in vivo e in vitro de a <i>Cercospora coffeicola</i>	33
	ARTIGO 3 Efeito da Casugamicina na <i>Cercospora coffeicola</i>: fungitoxidade e Influência na resistência a DMI's e a QoI	50

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro tem importância econômica e histórica para o Brasil, que é o principal produtor e exportador de café do mundo. Como em toda atividade agrícola, a cafeicultura tem como fator limitante de produção a ocorrência de doenças responsáveis por perdas quantitativas e qualitativas. Dentre elas destacam-se a cercosporiose, ou mancha-de-olho-pardo e a mancha-aureolada do cafeeiro.

A cercosporiose é uma das principais doenças do cafeeiro, causando perdas estimadas em 30% da produção. A doença tem como agente etiológico o fungo *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke. Esse patógeno é hemibiotrófico, considerado de difícil isolamento e cultivo em meio de cultura, fator limitante em estudos básicos sobre patossistemas envolvendo esse fungo. Nos últimos anos, a mancha-aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) ganhou destaque, sendo atribuídas a ela perdas de até 70%, em viveiros e em campos estabelecidos.

Para essas duas doenças, o controle químico tem sido a medida mais usual entre os produtores. Atualmente, existem 77 produtos registrados no Ministério da Agricultura para controlar a cercosporiose, os quais pertencem a seis grupos químicos diferentes. Entretanto, a maioria inclui os inibidores da demetilação (DMI [FRAC] código G1 – médio risco de resistência) e os inibidores da quinona oxidase (QoI [FRAC] código C3 – alto risco de resistência), respectivamente conhecidos como os triazóis e as estrobilurinas, seja em formulações únicas ou em mistura com outro ingrediente ativo. Para a mancha-aureolada, há quatro produtos registrados, três tendo como ingrediente ativo o hidróxido de cobre e um, a casugamicina. A intensificação de relatos de

severas epidemias de mancha-aureolada tornou comuns as pulverizações com casugamicina (FRAC, código D3 – médio risco), único antibiótico registrado para pulverizações em viveiros.

Na busca por melhores níveis de controles e maiores eficiências, são realizadas diversas aplicações desses defensivos. O uso indiscriminado de fungicidas de um mesmo grupo químico pode favorecer a seleção de organismos resistentes, a poluição ambiental e a intoxicação do aplicador, além de aumentar os resíduos de defensivos no produto final.

A resistência de organismos (fungos) a determinados defensivos agrícolas é um caráter estável, herdável, resultando na redução da sensibilidade do fungo ao fungicida, geralmente devido ao mau uso do mesmo, levando à seleção de organismos resistentes.

A resistência é um aspecto importante para o sucesso comercial de defensivos. Existem casos de produtos retirados do mercado que, devido ao mau uso, resultou em relatos de resistência, fazendo o produto entrar em descrédito frente ao agricultor.

Dessa forma, este estudo foi realizado com os seguintes objetivos: desenvolver técnica de isolamento para o fungo *Cercospora coffeicola* para estudos *in vitro*; após obter os isolados por essa técnica, verificar a eficiência de diferentes programas de aplicação de defensivos para controlar a cercosporiose; analisar a sensibilidade *in vitro* do isolado de *C. coffeicola* proveniente de experimento *in vivo* e evidenciar e verificar o efeito de aplicações de casugamicina na sensibilidade de *C. coffeicola*, além de estudar a ação da casugamicina na alteração da sensibilidade do fungo a fungicidas do grupo dos DMIs e dos QoIs.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cafeeiro

O cafeeiro é uma planta originária das regiões altas da Etiópia (Cafa e Enária), podendo ser a região de Cafa responsável pela origem do nome café (GRANER; GODOY JÚNIOR, 1967). No Brasil, foi inicialmente cultivado em áreas com condições edafoclimáticas favoráveis ao desenvolvimento e ao crescimento da cultura, mas, com o surgimento de técnicas de cultivos, passou a ser cultivado em quase todas as regiões (COELHO et al., 2009; FARIA et al., 2001; LIMA; CUSTÓDIO; GOMES, 2008).

O café destaca-se como uma das mais importantes culturas nacionais, sendo o país o maior produtor e exportador mundial. A área total ocupada pela cafeicultura (espécies arábica e conilon) no país totaliza 2.221.816,2 hectares. Minas Gerais é o estado com a maior área plantada, 1.204.208 mil hectares (54,2%), seguido por Espírito Santo, com 486.583 mil hectares. A terceira estimativa para a produção da safra cafeeira (espécies arábica e conilon), em 2014, indica que o país deverá colher entre 45,14 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

A ocorrência de doenças é um dos principais fatores responsáveis por perdas na cafeicultura, que vão desde a fase de viveiro até a produção final, pois mais de 90% da área plantada no Brasil é de cultivares suscetíveis às principais doenças dessa cultura. Dentre as doenças do cafeeiro está a cercosporiose que, devido à mudança nas áreas de cultivo e também à maior busca por produtividade com o uso de novas tecnologias, tem se agravado e gerado significativas perdas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

2.2 *Cercospora coffeicola*

O fungo hemibiotrófico *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke é o agente etiológico da doença conhecida como cercosporiose do cafeeiro ou mancha-do-olho-pardo. Ela pode causar até 30% de redução na produtividade (SANTOS, 2006), sendo uma das doenças mais antigas do cafeeiro, tanto na América do Sul, quanto na América Central. O primeiro relato da doença no país foi em 1887 (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997). Os sintomas nas folhas manifestam-se como manchas circulares, com 0,5-1,5 cm de diâmetro, com o centro acinzentado, envolvidas por um halo amarelado. Nos frutos, os sintomas são manchas castanhas deprimidas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010), encontradas principalmente nas partes mais expostas à insolação.

O fungo, considerado de difícil isolamento, produz conídios hialinos, multisseptados (quatro a sete) com 50-100 µm de comprimento por 3-4 µm de diâmetro, de extremidade afilada e a conidiogênese é do tipo holoblástica integrada com cicatrizes (ELLIS, 1976). O fungo *C. coffeicola* é capaz de produzir a toxina cercosporina, toxina não seletiva pertencente ao grupo das perylenequinonas, grupo que se caracteriza pela capacidade de absorver energia luminosa, sendo esta requerida tanto para a produção quanto para a ativação da toxina (EHRENSHAFT; UPCHURCH, 1991).

2.3 Isolamento de fitopatógenos

O isolamento de fungos a partir de materiais naturais contaminados com flora microbiana mista de bactérias e actinomicetos requer o conhecimento de diversos fatores. O isolamento de fitopatógenos é importante, pois dele é possível conhecer as estruturas físicas do organismo, bem como o modo como eles se desenvolvem e o seu período de incubação, até a expressão de sintomas no hospedeiro, podendo, por fim, obter-se um vasto conhecimento sobre o patógeno e tomar medidas mais eficazes e ágeis de combate, permitindo, consequentemente, ganho econômico maior (ARAUJO et al., 2002).

No caso dos fungos filamentosos, para o sucesso do isolamento há a necessidade de se evitar o crescimento rápido e desordenado de alguns fungos saprófitas. Diante desse problema, a desinfestação superficial deve ser feita mediante a exposição do material vegetal a álcool e a hipoclorito de sódio (ALFENAS et al., 2007).

O isolamento de fitopatógenos pode ser feito de duas formas. No método direto são utilizados os procedimentos de focalizar as estruturas do patógeno em lupa, flambar o estilete, resfriar a ponta do estilete tocando levemente no meio de cultura, transferir estruturas visualizadas para uma placa com meio de cultura, incubar até o aparecimento da colônia desejada e repicar a colônia em tubos com meio de cultura inclinado. No método indireto, primeiramente, é feita a desinfestação superficial, quando o material é lavado com água e detergente e enxugado com papel. Depois, com uma lâmina flambada, retiram-se fragmentos das margens da lesão e eles são depositados em solução aquosa de álcool 70%. Os fragmentos de tecidos são transferidos para a solução desinfestante, mantendo-os imersos na solução por 1 minuto. Esse procedimento é suficiente para eliminar os contaminantes. Com a pinça flambada removem-se os

fragmentos da solução desinfestante, depositando-os em placa de Petri contendo meio de cultura (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

Outro método é a utilização de iscas, o qual é utilizado especificamente para a detecção de patógenos causadores de tombamentos de mudas. Consiste em inserir porções vegetais isentas do patógeno alvo sobre o solo possivelmente infestado (ALFENAS et al., 2007), fazendo com que o patógeno seja atraído para isca e posteriormente isolado em meio de cultura, para futuras análises.

Embora diversos métodos de isolamento estejam descritos na literatura e façam parte de atividades de rotina em laboratórios de fitopatologia, para alguns patógenos o isolamento ainda é um passo que dificulta o estudo de certos patossistemas. Um exemplo é o fungo *C. coffeicola*.

Garcia Júnior et al. (2003), para realizar inoculação do patógeno em mudas de cafeeiro em solução nutritiva, realizaram a coleta e a extração dos conídios diretamente de folhas infectadas vindas do campo, devido à dificuldade de isolamento e de obtenção de inóculo em laboratório. Soares (2003) descreve a dificuldade de isolamento e de obtenção de inóculo, citando este como um dos principais motivos da existência de poucos estudos realizados o fungo *C. coffeicola* publicados ao longo dos anos, evidenciando a importância do desenvolvimento de metodologias específicas para isolamento de determinados patógenos.

2.4 Controle químico

O controle químico é a principal e, muitas vezes, a única medida de controle utilizada para controle da cercosporiose. Atualmente, existem 77 produtos registrados no Ministério da Agricultura para controle de cercosporiose, os quais pertencem a seis grupos químicos diferentes que são

fungicidas cúpricos, estrobilurinas, benzimidazóis, isoftalonitrila, ditiocarbamatos e triazóis (BRASIL, 2014).

O maior número de produtos é o grupo dos triazóis, seja em formulação única ou em mistura com outro ingrediente ativo (geralmente estrobilurinas). Este grupo de fungicidas apresenta sucesso comercial para o controle desta enfermidade. Em trabalho testando diferentes moléculas de fungicidas em sete diferentes isolados de *C. coffeicola*, Lombardi (2002) verificou que os fungicidas propiconazole e tebuconazole, ambos do grupo dos triazóis, são os mais eficientes na inibição *in vitro* do crescimento micelial dos isolados.

2.5 Resistência de fungos a fungicidas

Os fungicidas são essenciais para a manutenção viável e elevada da qualidade dos produtos agrícolas. Até 1970, quase todos os fungicidas utilizados para controlar patógenos de plantas eram de multissítios de ação, com efeito protetor. Apesar do uso generalizado, a resistência a esses compostos foi evento raro. No entanto, com a introdução dos fungicidas com sítio-específico, no final dos anos 1970, fungos fitopatogênicos resistentes a fungicidas tornaram-se problema importante na proteção das culturas (BRENT, 1995).

A resistência a fungicidas é um caráter estável, herdável, resultando na redução da sensibilidade do fungo ao fungicida. O uso prolongado de uma mesma substância química para controlar doenças tem resultado no desenvolvimento de resistência em muitos fungos fitopatogênicos (GEORGOPOULOS, 1982).

A resistência pode ser resultante de mutações de um único gene ou de múltiplos genes. Isolados resistentes surgem a partir de uma taxa natural baixa de mutações genéticas. Estes isolados são menos afetados quando expostos a fungicidas. Uma vez que o fungicida pode controlar eficazmente isolados

sensíveis, os isolados resistentes podem tornar-se dominantes nas populações dos patógenos. Desse modo, sob a pressão de seleção do uso de fungicidas ao longo do tempo, falhas no controle da doença podem, eventualmente, ocorrer (SCHNABEL; JONES, 2001).

Pode-se associar o risco de resistência de fungicidas com a sua sistematicidade. Os fungicidas protetores apresentam amplo espectro de ação. Por interferirem em diversos processos metabólicos vitais do fungo, esses produtos apresentam baixo risco de resistência ao patógeno. Os fungicidas de ação sistêmica apresentam maior especificidade. Esta especificidade facilita a ocorrência de mutações pontuais e, conseqüentemente, favorece o aparecimento de isolados mutantes do patógeno resistentes a esses fungicidas. Os fungicidas de ação translaminar, como as estrobilurinas, também têm ação específica sobre o patógeno e apresentam alto risco de resistência (RODRIGUES et al., 2007).

Contudo, a falha de controle não depende exclusivamente da ocorrência de um mutante insensível à determinada molécula, que irá depender da falha de controle. A aptidão ecológica de isolados resistentes a fungicida é fator crucial para determinar a persistência do genótipo resistente, uma vez que eles são selecionados. Em muitos casos, isolados resistentes podem ter menor aptidão que isolados sensíveis, portanto, sua dominância na população fica comprometida na ausência da pressão de seleção do fungicida. Alternativamente, isolados resistentes podem apresentar características semelhantes às de isolados sensíveis e persistirem durante longo período de tempo, mesmo sem utilização dos fungicidas (ZHONGHUA; MICHAILIDES, 2005).

A resistência a fungicidas pode ser conferida por vários mecanismos (MCGRATH, 2001), incluindo

- a) alteração sítio alvo, reduz a ligação do fungicida ao fungo;
- b) a síntese de enzima alternativa capaz de substituir a enzima alvo;

- c) a superprodução do alvo do fungicida;
- d) a ativação do efluxo celular reduzindo absorção do fungicida.

Além disso, alguns mecanismos ainda não conhecidos também podem ser responsáveis por resistência a fungicidas.

2.5.1 Monitoramento de sensibilidade

A mudança de sensibilidade de um isolado é um evento significativo com implicações práticas e tem de ser monitorada. Um dos métodos mais utilizados para a determinação de sensibilidade de um microrganismo é a determinação da concentração inibitória de 50% (CI_{50}), que pode ser calculada segundo adaptação da metodologia descrita por Baker (1970).

De acordo com os critérios propostos por Edgington, Khew e Barron (1971), compostos químicos com CI_{50} menor que 1 ppm são considerados altamente fungitóxicos; com CI_{50} entre 1 e 50 ppm, moderadamente fungitóxicos e com CI_{50} maior que 50 ppm, não tóxicos. Porém, em pesquisas recentes, esse critério vem sendo questionado, pois a diferença entre 1 e 50 ppm é muito elevada para se enquadrar em categoria única. Bampi et al. (2013) sugerem, para *Phakopsora pachyrhizi*, que substâncias com $CI_{50} < 0,1$ ppm sejam consideradas altamente fungitóxicas; com CI_{50} entre 0,1 e 20 ppm, fungitóxicas; CI_{50} entre 21 e 100 ppm, moderadamente fungitóxica e $CI_{50} > 100$ ppm, substância não tóxica.

Outra variável a ser analisada é a determinação da linha de sensibilidade “baseline”, feita pela verificação de CI_{50} de uma população do patógeno. A determinação da “baseline” apresenta um passo fundamental no processo de monitoramento (MCKAY; FÖRSTER; ADASKAVEG, 2012).

O processo de monitoramento da resistência pode ser útil diante de algumas situações. São elas: (I) durante o desenvolvimento de nova molécula de fungicida e sua introdução no mercado, (II) na análise de falhas do produto e rumores de casos de resistência, (III) no acompanhamento de áreas, para a verificação do sucesso de estratégias de controle e (IV) na determinação da estabilidade da resistência (ao longo dos anos ou após a retirada do fungicida do mercado) (HOBBELEN; PAVELEY; BOSCH, 2011).

Outro ponto importante a ser considerado durante o monitoramento é que fungicidas pertencentes ao mesmo grupo químico podem apresentar resistência cruzada. Entre os benzimidazóis, o carbendazim e o tiofanato metílico são os produtos utilizados para citros e passíveis de resistência cruzada. Para as estrobilurinas, a resistência cruzada pode ocorrer para azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobin, por exemplo. A resistência múltipla, entretanto, refere-se à resistência a dois ou a mais fungicidas com mecanismos de ação distintos, ou seja, diferentes fatores genéticos resultariam em resistência à casugamicina e a triazóis, por exemplo (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2007). Essa informação define quais ingredientes ativos devem ser testados e qual a influência deles no processo de mutação ou na seleção de isolados resistentes.

2.6 Influência da casugamicina

Grandes epidemias da mancha-aureolada do cafeeiro (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) têm sido relatadas, nos últimos anos, no Brasil (CAFÉ POINT, 2014; PRÓ-CAFÉ, 2014). A intensificação de relatos de severas epidemias desta doença, acrescida à redução de produção, cerca de 70% (ZOCOLLI; TAKATSU; UESUGI, 2011), levou os produtores a utilizarem massivamente o controle químico como forma de conter a doença. Pulverizações

com casugamicina, único antibiótico registrado para o controle no Brasil, com registro exclusivo para viveiros (BRASIL, 2014), produtos à base de cobre e misturas com mancozeb são frequentes e, muitas vezes, feitas de forma indevida.

Os efeitos destas aplicações indevidas da casugamicina para o controle da mancha-aureolada em campos de produção, como ocorreu nas últimas safras, ainda não foram estudados. Avaliações sobre resíduos do antibiótico nos frutos de café, o efeito da aplicação deste antibiótico sobre a curva de progresso de outros patógenos que atacam o cafeeiro e a influência da aplicação indevida da casugamicina em campos comerciais sobre a sensibilidade de outros patógenos a fungicidas com eficiência já comprovada permanecem sem respostas por falta de estudos.

A casugamicina é um antibiótico/fungicida sistêmico com propriedades tanto protetoras quanto curativas, inicialmente desenvolvida como fungicida para controlar brusone (*Pyricularia oryzae*). Por apresentar modo de ação amplo, inibição da biossíntese de proteínas, atualmente, seu principal uso tem sido controle de bacterioses (PSALLIDAS et al., 2000).

Devido ao seu uso intensivo, casos de resistência têm sido relatados. McGhee e Sundin (2011) determinaram que a exposição de *Erwinia amylovora* a baixas concentrações de casugamicina aumentou o risco de desenvolvimento de resistência espontânea. Miura et al. (1976) e Miura, Ito e Takahashi (1975) verificaram falhas no controle de brusone em arroz, descrevendo a ocorrência natural de isolados de *P. oryzae* resistentes à casugamicina. Em estudos envolvendo resistência de *P. oryzae* à casugamicina foram relatados que apresentaram características de resistência cruzada à blasticidina S. e a polyoxin D. Ito e Yamaguchi (1977) afirmam a existência de forte probabilidade de resistência múltipla, por existirem multigenes envolvidos na resistência à casugamicina.

2.7 Mecanismos moleculares de resistência

2.7.1 Inibidores da desmetilação (DMIs)

Os produtos do grupo dos DMIs inibem precursores do esterol, componente da membrana de organismos eucariontes. Em outras palavras, este grupo de defensivos atua inibindo a síntese do ergosterol, componente da membrana celular de importantes fungos fitopatogênicos.

Os DMIs compreendem grande número de fungicidas comercialmente bem sucedidos. Este sucesso comercial é embasado em sua eficácia no controle de epidemia, o que levou ao uso muitas vezes indiscriminado, resultando nos primeiros relatos de resistência na década de 1990. Desde então, vários casos de resistência têm sido relatados e estudados (DELYE; LAIGRET; CORIO-COSTET, 1997; KÖLLER; WILCOX, 1999; MA et al., 2002) e alguns mecanismos de resistência foram elucidados.

Um dos principais mecanismos, e também o mais estudado, refere-se ao gene *CYP51*. Estudos com o fungo *Uncinula necator*, agente causal do oídio da videira, evidenciaram isolados resistentes ao triadimenol, apresentando uma mutação única, conduzindo à substituição de fenilalanina para tirosina (DELYE; LAIGRET; CORIO-COSTET, 1997). Esta mesma mutação no códon Y136F deste gene foi encontrada em isolados resistente do fungo *Erysiphe graminis* sp. *hordei* (DELYE; BOUSSET; CORIO-COSTET, 1998).

Albertini, Gredt e Leroux (2003), analisando sequência de DNA do gene *CYP51* de diferentes fungos, observaram que, na posição 180 deste gene em *T. yallundae* e em outros fungos filamentosos sensíveis a DMIs, ocorre a codificação do aminoácido fenilalanina e no fungo *Tapesia acuformis*, naturalmente resistente aos triazóis, a posição 180 codifica para leucina, o que sugere que a mudança neste códon esta envolvida na resistência natural a

triazóis. Além disso, outras alterações em aminoácidos, devido ao gene *CYP51* em diferentes patógenos, *Penicillium italicum* (JOSEPH-HORNE; HOLLOMON, 1997) e *Ustilago maydis* (BUTTERS; ZHOU; HOLLOMON, 2000), foram descritas como associadas com resistência a DMIs em laboratório.

Mecanismos para aumento da expressão do gene *CYP51* foram identificados em *Venturia inaequalis*. Isolados resistentes, com elevada expressão de *CYP51*, tinham inserção de 553 pares de base localizada na região promotora (SCHNABEL; JONES, 2001). Esta expressão elevada do *CYP51* foi responsável pela resistência de alguns isolados do fungo à fungicida do grupo dos DMIs, entretanto, nem todos os isolados resistentes encontrados no campo tinham essa inserção, o que pressupõe que a resistência a DMIs deve estar ligada a outros pontos de mutação.

2.7.2 Fungicidas inibidores QO (QoIs)

Fungicidas conhecidos como QoIs têm como precursor o fungo *Strobilurus tenacellus*, do qual foi identificada a primeira substância do grupo das estrobilurinas. Metabólitos deste fungo foram isolados, identificados e sintetizados e, atualmente, é o grupo de defensivos mais comercializado na agricultura. Tais moléculas fazem parte do grupo dos inibidores de quinona oxidase (QoI), cuja toxicidade advém da inibição da cadeia respiratória, mais precisamente no Complexo III, impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, interferindo na respiração do patógeno (BARTLETT et al., 2002).

Logo após os QoIs terem sido introduzidos no mercado, em 1996, isolados resistentes a QoIs foram detectados em importantes patógenos (BARTLETT et al., 2002). Na maioria dos casos, a resistência a QoI foi conferida por um ponto mutação no gene (*CYT b*) do citocromo b

mitocondrial. Esta mutação conduz à alteração do aminoácido fenilalanina para leucina no códon 129 (*F129L*), ou da glicina para alanina no códon 143 (*G143A*).

Mutações genéticas ocorrem em grande quantidade em seres vivos, entretanto, nem todas elas são herdáveis e conferem características evolutivas vantajosas. Existem casos em que organismos apresentam mutação que confere a eles resistência a determinado defensivo, entretanto, tal mutação também altera outra característica, por vezes desfavorável diante da seleção natural. Um exemplo disso foi elucidado por Avila-Adame e Köller (2003), que verificaram duas mutações em isolado resistente a QoI de *Magnaporthe grisea* criado em laboratório, sendo a primeira em *G143A* e a segunda no códon *G143S* (glicina para serina). Os autores, estudando estas mutações, observaram que elas permaneceram estáveis durante quatro ciclos consecutivos da doença, na ausência de azoxistrobina, um fungicida do grupo dos QoI. O teste de algumas variáveis para medir o efeito desta alteração genética revelou que o isolado mutante em *G143A* não teve sua produção de conídios afetada, enquanto a produção de conídios do mutante *G143S* foi significativamente menor. Portanto, os mutantes em *G143S* devem possuir baixa aptidão em condições de campo.

Diante disso, tem-se que o controle químico é o principal método de controle utilizado na agricultura e a resistência é um problema que está presente e que necessita de monitoramento e estudos para a elaboração de métodos que visem à sua prevenção e ao seu manejo.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sendo o controle químico o principal método de controle utilizado e a resistência um dos seus principais entraves, tornam-se necessários o monitoramento e os estudos para a elaboração de métodos que visem à sua prevenção e ao seu manejo. Monitorar sensibilidade de populações e eficiência de moléculas fornece informações que auxiliam a permanência de defensivos agrícolas e garante opções de controle para o produtor.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, C.; GREDT, M.; LEROUX, P. Mutations of the β -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acutormis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 64, n. 1, p. 17-23, 1999.
- ALFENAS, A. C. et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 61-90.
- ARAÚJO, W. L. et al. **Isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.
- AVILA-ADAME, C.; KÖLLER, W. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. **Current Genetics**, New York, v. 42, n. 6, p. 332-338, 2003.
- BAKER, K. F. Types of *Rhizoctonia* diseases and their occurrence. In: PARMETER JUNIOR, J. R. (Ed.). ***Rhizoctonia solani*, biology and pathology**. Berkeley: University of California, 1970. p. 125-148.
- BAMPI, D. et al. Sensibilidade de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas sensibility of *Stenocarpella macrospora* to fungicide. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 4, p. 787-795, 2013.
- BARTLETT, D. W. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: 20 nov. 2014.
- BRENT, K. J. **Fungicide resistance in crop pathogens, how can it be managed**. Brussels: Global Crop Protection Federation, 1995. 52 p.
- BUTTERS, J. A.; ZHOU, M. C.; HOLLIMON, D. W. The mechanism of resistance to sterol 14 α demethylation inhibitors in a mutant (Erg 40) of *Ustilago maydis*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 3, p. 257-263, 2000.

CAFÉ POINT. **Preocupação dos cafeicultores, mancha Aureolada é tema de palestra de pesquisadora do Instituto Biológico de Campinas.** Disponível em: <<http://www.cafepoint.com.br/radares-tecnicos/folha-procafe/preocupacao-dos-cafeicultores-mancha-aureolada-e-tema-de-palestra-de-pesquisadora-do-instituto-biologico-de-campinas-86234n.aspx>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

COELHO, G. et al. Efeito de épocas de irrigação e de parcelamentos de adubação sobre a produtividade do cafeeiro ‘Catuaí’. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 67-73, jan./fev. 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Boletim da safra brasileira de café.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_17_09_29_46_boletim_cafe_-_original_normalizado.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.

DELYE, C.; BOUSSET, L.; CORIO-COSTET, M. F. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14a-demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminisf. sp. hordei*, a ‘recalcitrant’ fungus. **Current Genetics**, New York, v. 34, n. 5, p. 399-403, Oct. 1998.

DELYE, C.; LAIGRET, F.; CORIO-COSTET, M. F. A mutation in the 14a-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 8, p. 2966-2970, 1997.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods.** Boca Raton: CRC, 1995. 434 p.

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

EHRENSHAFT, M.; UPCHURCH, R. G. Isolation of light-enhanced cDNAs of *Cercospora kikuchii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2671-2676, Sept. 1991.

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous hyphomycetes.** Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.

FARIA, M. F. et al. Influência das lâminas de irrigação na maturação e produtividade do cafeeiro (*Coffea arabica* L.): 1ª colheita. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM CAFEICULTURA IRRIGADA, 4., 2001, Araguari. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2001. p. 11-14.

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 286-291, 2003.

GEORGOPOULOS, S. G. Detection and measurement of fungicide resistance in. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G. (Ed.). **Fungicide resistance in crop protection**. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p. 24-31.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas e seu controle**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 184-200.

GRANER, E. A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: Melhoramentos, 1967. 320 p.

HOBBELEN, P. H. F.; PAVELEY, N. D.; BOSCH, F. van den. Delaying selection for fungicide insensitivity by mixing fungicides at a low and high risk of resistance development: a modeling analysis. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 10, p. 1224-1233, 2011.

ITO, H.; YAMAGUCHI, T. Occurrence of kasugamycin resistant rice blast fungus influenced by the application of fungicides. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 43, p. 301-303, 1977.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D. W. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 149, n. 2, p. 141-149, 1997.

KOLLER, W.; WILCOX, W. F. Evaluation of tactics for managing resistance of *Venturia inaequalis* to sterol demethylation inhibitors. **Plant Disease**, Quebec, v. 83, n. 9, p. 857-863, 1999.

LIMA, L. A.; CUSTÓDIO, A. A. P.; GOMES, N. M. Produtividade e rendimento do cafeeiro nas cinco primeiras safras irrigado por pivô central em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1832-1842, nov./dez. 2008.

LOMBARDI, A. P. Z. **Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de *Cercospora coffeicola***. 2002. 140 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2002.

MA, Z. et al. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, n. 9, p. 829-835, 2002.

MCGHEE, G. C.; SUNDIN, G. W. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 2, p. 192-204, 2011.

MCGRATH, M. T. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experiences and challenges. **Plant Disease**, Quebec, v. 85, n. 3, p. 236-245, 2001.

MCKAY, A. H.; FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J. E. Toxicity and resistance potential of selected fungicides to galactomyces and *Penicillium* spp. causing postharvest fruit decays of citrus and other crops. **Plant Disease**, Quebec, v. 96, n. 1, p. 87-96, 2012.

MIURA, H. et al. Mode of occurrence of kasugamycin resistant rice blast fungus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 42, p. 117-123, 1976.

MIURA, H.; ITO, H.; TAKAHASHI, S. Resistant strains of *Pyricularia oryzae* to kasugamycin as a cause of diminished fungicidal activity to rice blast. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 41, p. 415-417, 1975.

POZZA, E. A.; CARVALHO, L. V.; CHALFOUN, S. M. Sintomas e injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.

PRÓ-CAFÉ. Doença em cafezais preocupa propriedades no sul de MG.

Disponível em:

<<http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php/index.php?tipo=ler&mat=51472&preocupacao-dos-cafeicultores--mancha-aureolada-e-tema-de-palestra-de-pesquisadora-do-instituto-biologico-de-campinas-.html>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

PSALLIDAS, P. G. et al. Chemical control of fire blight. In: _____. **Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora**. London: CABI, 2000. p. 199-234.

RODRIGUES, M. B. C. et al. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 323-327, mar. 2007.

SANTOS, F. S. **Epidemiologia e manejo de doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) sob cultivo orgânico**. 2006. 146 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SCHNABEL, G.; JONES, A. L. The 14a-demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistance to myclobutanil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 5, p. 102-110, 2001.

SOARES, D. J. **Esporulação e germinação 'in vitro' de conídios de *Cercospora coffeicola***. 2003. 31 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2007. v. 2, p. 165-180.

ZHONGHUA, M.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, n. 10, p. 853-863, 2005.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 843-849, 2011.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Nova técnica para isolar *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro

Artigos submetidos ou aceitos para publicação em periódicos

Artigo Publicado: Santos, L. A., de Souza, P. E., Pozza, E. A., Caldeira, D. M., & dos Santos Botelho, D. M. (2014). Nova técnica para isolar *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro. *Coffee Science*, 9(1), 142-144.

Universidade Federal de Lavras /UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP -
Cx. P. 3037 - 37200-000 - Lavras - MG
leandro.alvarenga.s@hotmail.com, pauleste@ufla.br, eapozza@ufla.br,
douglasmassimo@hotmail.com, deilamagna@hotmail.com

RESUMO

A mancha-do-olho-pardo é uma doença endêmica no Brasil. Poucos são os trabalhos publicados sobre esta doença, devido à dificuldade de isolamento e de produção de inóculo do fungo *Cercospora coffeicola*. Diante disso, este trabalho visa divulgar a técnica de isolamento desenvolvida e utilizada na Universidade Federal de Lavras, denominada técnica da pipeta, por meio da qual mais de 100 isolados já foram obtidos para estudos futuros do agente etiológico dessa importante doença.

Palavras-chave: *Cercospora coffeicola*, Isolamento, Técnica da Pipeta.

ABSTRACT

The stain brown eye is an endemic disease in Brazil. There are few published studies on this disease because of the difficulty of isolation and production of the fungus *Cercospora coffeicola*. In view of this work aims to disseminate this isolation technique developed and used in UFLA called Pipette Technique. Through this already over 100 isolates were obtained for future studies of the etiologic agent of this important disease.

Keywords: *Cercospora coffeicola*, Isolation, Pipette Technique.

A cercosporiose é uma das principais doenças do cafeeiro e pode reduzir tanto a produtividade (Pozza, 2010) quanto a qualidade da bebida do café (Lima, 2012), o que torna essencial a realização de estudos sobre sua etiologia, epidemiologia e fisiologia, entre outros, para incrementar o controle da doença. Dessa forma, torna-se necessário isolar o patógeno para obter inóculo viável e em quantidade suficiente para proceder à infecção de plantas destinadas a pesquisas diversas. Porém, é difícil tanto isolar quanto obter inóculo de *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke em quantidade suficiente para proceder à inoculação, com os métodos descritos na literatura. Esse é um dos principais motivos da existência de poucos estudos realizados, visando esclarecer aspectos da ecologia, da epidemiologia e da fisiologia desta doença com o fungo *C. coffeicola*, ao longo dos anos (Soares, 2003).

Diante disso, este trabalho foi realizado com o objetivo de divulgar nova técnica de isolamento para o fungo *C. coffeicola*.

A metodologia consiste na coleta das folhas com sintomas característicos da doença. Posteriormente, elas são levadas ao laboratório, onde é realizada a desinfestação superficial com solução de álcool 50% (álcool 95°GL + água destilada) por borrifamento nas faces abaxiais e adaxiais das folhas. As mesmas são colocadas para secar em condição ambiente, em local limpo e arejado, sobre papel de filtro esterilizado.

Depois de secas, as folhas são incubadas em câmara úmida, ou seja, em sacos plásticos transparentes, com um pedaço de algodão umedecido com água destilada. O saco plástico é lacrado e deixado em local limpo, à temperatura ambiente (média de 23 °C) e com iluminação constante (três lâmpadas fluorescentes de 40 watts cada, a 3,7 m da bancada), por um período de 48 horas (Custodio 2010).

Retiradas da câmara úmida, as folhas com sintomas devem ser levadas a um estereomicroscópio binocular, no qual é realizada a observação das lesões. Selecionam-se as lesões com estruturas de reprodução visíveis, conidióforos e

conídios (Fig 1 – A). Com o auxílio de uma pipeta, colocam-se de 20 a 30 μ L de água destilada esterilizada sobre a lesão (Fig 1 – B), de modo que a gota d'água cubra as estruturas de reprodução do fungo. Então, com auxílio de estilete ou de agulha, realiza-se leve raspagem na superfície foliar com a água, para retirar as estruturas da lesão e deixá-las dispersas na água (Fig 1 – C).

Logo após, retira-se a água da superfície da lesão, com auxílio da pipeta (Fig 1 – D) e deposita-se a solução em placa de Petri. Neste caso, empregou-se o meio malte (20 g de malte, 20 g de ágar e 1 L de água).

A placa com a suspensão é levada à capela de fluxo, em que a mesma é espalhada sobre toda superfície da placa, com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas são incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C, por 72 horas, sendo possível identificar as colônias de *C. coffeicola* e repicá-las, a fim da obter cultura pura.

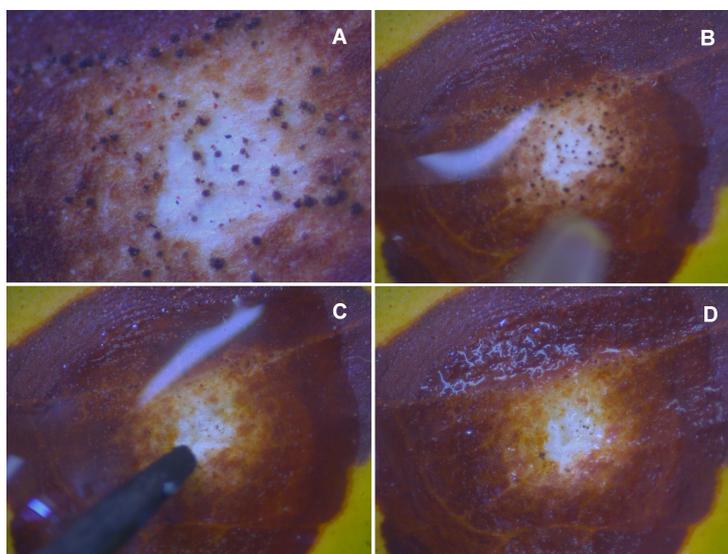


Figure 1 A) Observação das estruturas de reprodução de *C. coffeicola* nas lesões. B) Deposição da gota de água sobre a lesão com auxílio da pipeta. C) Obtenção da solução com as estruturas de reprodução. D) Retirada da solução da superfície foliar

Esta metodologia foi denominada técnica da pipeta. Com ela, foi possível obter mais de 100 isolados puros e viáveis de *C. coffeicola* de diferentes regiões de Minas Gerais e de outros estados, como Bahia, Espírito Santo e São Paulo, no Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Lavras.

Referências Bibliográficas

CUSTÓDIO, A. A. P., POZZA, E. A.; CUSTÓDIO, A. A. P.; SOUZA, P. E.; LIMA, L. A.; LIMA, L. M. Intensidade da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro quanto à face de exposição das plantas. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 3, p. 214-228, set./dez. 2010

LIMA, L. M.; POZZA, E. A.; SILVA SANTOS, F. Relationship between Incidence of Brown Eye Spot of Coffee Cherries and the Chemical Composition of Coffee Beans. **Journal of Phytopathology**, v. 160: p. 209–211, Abril. 2012.

POZZA, E. A.; CARVALHO, L. V.; CHALFOUN, S. M. Sintomas e injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro**: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.

SOARES, D. J, **Esporulação e germinação ‘in vitro’ de conídios de Cercospora coffeicola**. 2003. p. 31. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

ARTIGO 2

Resistência *in vivo* e *in vitro* de *Cercospora coffeicola*.

Preparada em concordância com as normas do periódico “**Plant Diseases**”

(Versão preliminar)

Santos, L.A ; Souza, P.E ; Pozza E. A.; Dornelas, G. A.; Paula, P. V. A. A.
Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Universidade Federal de Lavras /UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP -
Cx. P. 3037 - 37200-000 - Lavras - MG
leandro.alvarenga.s@hotmail.com, pauleste@ufla.br, eapozza@ufla.br

Resistência *in vivo* e *in vitro* de *Cercospora coffeicola*

Leandro Alvarenga Santos, Paulo Estevão de Souza, Edson Ampélio Pozza,
Gabriel Avelar Dornelas e Paulo Victor Augusto Azevedo de Paula.

Resumo: A cafeicultura brasileira tem papel de destaque no mundo. O país é o maior produtor mundial e o segundo mercado consumidor de café. Dentre as doenças que afetam a cultura tem-se a cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), doença controlada, predominantemente, por aplicações de fungicidas, DMI e QoI. O trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar diferentes programas de aplicação de fungicidas no controle da cercosporiose do cafeeiro e verificar a sensibilidade *in vitro* da *C. coffeicola* aos diferentes ingredientes ativos utilizados. No experimento *in vivo* foram aplicados diferentes fungicidas, em formulações simples e em misturas dos grupos químicos DMI e QoI; em três aplicações foi avaliada a incidência da doença e descrita a curva de progresso e calculada a AACPD. No experimento *in vitro* foi avaliada a sensibilidade de *C. coffeicola* aos ingredientes ativos utilizados no experimento *in vivo*, por meio da IC₅₀, da concentração inibitória mínima (CIM) e da porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM). O programa de pulverizações com fungicidas compostos por azoxistrobina e ciproconazol não foi eficiente, apresentando AACPD (1.968,75) iguais ao da testemunha (2.148,44). As curvas de progresso da incidência da cercosporiose do cafeeiro demonstraram que o mesmo tratamento apresentou valores de incidência superiores ao da testemunha a partir de abril, demonstrando a ineficiência da última pulverização com ciproconazol. O ciproconazol foi o único ingrediente ativo a apresentar algum grau de resistência para as todas as variáveis analisadas no experimento *in vitro*.

Palavras-chave: Triazóis, Estrobilurinas, Cafeeiro, Cercosporiose, controle químico.

Abstract: The Brazilian coffee has a major role in the world. The country is the world's largest producer and second consumer market. Among the diseases that affect the culture has to Cercospora leaf spot (*Cercospora coffeicola*) controlled disease predominantly of fungicide applications, DMI and QoI. The objective was to evaluate different fungicide application programs in control of Cercospora leaf spot of coffee and check the '*in vitro*' susceptibility of *C. coffeicola* to different active ingredients used. In the *in vivo* experiment were applied fungicides in simple formulations and the chemical groups DMI and QoI mixtures in three applications we evaluated the incidence of the disease and described the progress curve and calculated AUDPC. '*In vitro*' experiment was to evaluate the sensitivity of *C. coffeicola* the active ingredients used in the *in vivo* experiment, using the IC₅₀ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the percentage of mycelium growth inhibition (MGI). The fungicide spray program consisting of Azoxystrobin and Cyproconazole was not efficient, with AUDPC (1968.75) equal to the control (2148.44). The progress curves of the coffee incidence of Cercospora leaf spot showed that the treatment had a higher incidence of control values as of April, demonstrating the ineffectiveness of the last spraying Cyproconazole. The Cyproconazole was the only active ingredient to provide some degree of resistance to all variables '*in vitro*' experiment.

Keywords: Triazoles, Strobilurins, Coffee, Brown Eye Spot of Coffee, Chemical control.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café (*Coffea arabica* L.) e o segundo maior mercado consumidor. Uma das mais severas doenças dessa cultura é a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke). Os sintomas nas folhas manifestam-se como manchas circulares, com 0,5-1,5 cm de diâmetro, com o centro acinzentado, envolvidas por um halo amarelado. Nos frutos, encontram-se manchas castanhas deprimidas, localizadas, principalmente, nas partes mais expostas à insolação (Pozza et al., 2010).

Atualmente, o principal método de controle desta doença é o controle químico, devido ao fato de a maioria da área cultivada estar plantada com cultivares suscetíveis. Apesar do grande número de produtos registrados para controle da cercosporiose no cafeeiro (77 produtos) e de haver uma quantidade considerável de produtos multissítios de ação, o controle é feito com compostos de ação específica. Dentre estes se destacam os inibidores da quinona oxidase (QoIs), entre eles a piraclostrobina, a trifloxistrobina, a azoxystrobina e a picoxtrobina e os inibidores da síntese de esteróis (DMIs), como o epoxiconazol, o tebuconazol, o ciproconazol, o flutriafol, o triadimenol, o difeconazol e o propioconazol (AGROFIT, 2014).

A utilização sucessiva de produtos com sítios específicos de ação é uma das principais causas de seleção de organismos resistentes. Esse tipo de controle é considerado errado, do ponto de vista da sustentabilidade das atuais estratégias controle das doenças de plantas (Brent & Hollomon, 2007). Existem diferentes percepções do termo "resistência", na literatura científica. A categorização da resistência varia de acordo com a variável analisada. Yan et al. (2014) consideram que isolados que têm concentração inibitória mínima (CIM), em teste *in vitro*, acima da dosagem utilizada em pulverização em campos comerciais, são considerados altamente resistentes. Piqueiras et al. (2014)

consideram altamente resistentes apenas isolados que têm seu crescimento micelial inibido a valores menores que 20% na dosagem de campo. Demais autores evidenciam a necessidade da determinação da baseline de sensibilidade para a determinação de resistência.

Isolados de espécies patogênicas do gênero *Cercopora* com baixa sensibilidade ou resistentes têm sido descritos e estudados ao longo dos anos. Bolton et al. (2012) estudaram a sensibilidade de isolados de *C. beticola* a diferentes moléculas de DMI (tetraconazol, prothioconazol e difeconazol). Já Bradley and Pedersen (2011) analisaram a sensibilidade de isolados de *C. zeaemaydis* a moléculas de QoI (azoxystrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina).

Embora a resistência de patógenos a defensivos seja um assunto de interesse global, escassos são os trabalhos realizados no Brasil, ao longo dos anos. Relatos de produtores sobre a ineficiência de moléculas de ação específica são observados de forma frequente. Diante do presente contexto, o trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a eficiência de diferentes programas de pulverização de defensivos para controle da cercosporiose e analisar a sensibilidade *in vitro* do isolado de *C. coffeicola* proveniente deste local.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio *In vivo*

O trabalho foi desenvolvido em um campo comercial situado no município de Lavras, MG, à latitude de 21° 14' 44" S, longitude de 44° 57' 10" O e altitude de 968 m. A cultivar utilizada foi a Catuaí Vermelho IAC 144, com espaçamento de 3,5 m entre linhas e 0,80 m entre plantas (população de 3.571 plantas ha⁻¹). O delineamento experimental do ensaio foi em blocos ao acaso, com cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando 20 parcelas experimentais, formadas por 10 plantas, sendo as oito plantas centrais a parcela útil (Tabela 1). Os tratamentos foram compostos por aplicações de diferentes fungicidas em diferentes épocas, seguindo calendário utilizado com frequência em campos de produção comercial, com doses, números e épocas de aplicação recomendados pelas empresas.

Realizaram-se cinco avaliações mensais da incidência da cercosporiose em 100 folhas por parcela, entre os meses de janeiro e maio de 2013. Com os valores obtidos da avaliação da incidência da cercosporiose em folhas foram plotadas as curvas de progresso da doença para cada tratamento e os dados previamente transformados em área abaixo da curva de progresso da incidência da cercosporiose (AACPIC), proposta por Shaner & Finney (1977). Foi realizada análise de variância para a incidência da AACPIC, seguida do teste de agrupamento de médias Tukey, a 5% de probabilidade.

Sensibilidade de *C. Coffeicola* aos ingredientes ativos

Por meio da metodologia descrita por Santos et al. (2014) obteve-se um isolado monospórico de folhas de cafeeiro coletadas nas parcelas da testemunha do experimento *in vivo*, que apresentavam sintomatologia característica de cercosporiose. A identificação do isolado foi realizada com base em caracteres

morfológicos e o mesmo encontra-se na coleção do Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Lavras, UFLA.

Levantamento de sensibilidade fungicida foi realizado por testes com dois fungicidas do grupo dos QoIs (azoxystrobina e piraclostrobina) e três fungicidas DMIs (ciproconazol, flutriafol e epoxiconazol). A escolha dos ingredientes ativos a serem testados no experimento *in vitro* foi realizada com base na composição dos produtos comerciais utilizados no experimento *in vivo*. Para a avaliação destes ingredientes ativos utilizaram-se fungicidas comerciais com ingrediente ativo único.

A concentração inibitória a 50% (IC₅₀), a concentração inibitória mínima (CIM) e o percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) foram determinados por meio do crescimento micelial do isolado de *C. coffeicola* em meio de cultura malte contendo diferentes concentrações de azoxystrobina (250; 25; 2,5; 0,25; 0,025 e 0 ug ia/mL), piraclostrobina (400; 40; 4,0; 0,4; 0,04 e 0 ug ia/mL), ciproconazol (187; 18,7; 1,87; 0,187; 0,0187 e 0 ug ia/mL), flutriafol (250; 25; 2,5; 0,25; 0,025 e 0 ug ia/mL) e epoxiconazol (150; 15; 1,5; 0,15; 0,015 e 0 ug ia/mL). A fusão dos fungicidas ao meio de cultura malte foi realizada quando este ainda se encontrava em fase líquida, à temperatura próxima de 45 °C após autoclavagem. Em seguida, a mistura (meio malte + fungicidas) foi vertida em placas de Petri (10 mL/placa). Após a solidificação do meio, foi depositado no centro de cada placa de Petri um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura com micélio do isolado de *C. coffeicola*. As placas foram mantidas em incubação, a 25 °C e fotoperíodo, por sete dias. A avaliação do diâmetro da colônia foi realizada sete dias após a transferência dos discos de micélio para as placas com meio de cultura e o fungicida. O experimento foi instalado utilizando-se delineamento em blocos casualizados, composto por quatro blocos e foi realizado duas vezes.

4 RESULTADOS

Incidência da cercosporiose em folhas do cafeeiro

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para a AACPIC. Os tratamentos azoxystrobina e flutriafol + epoxiconazol (953,12), ciproconazol e flutriafol (1.289,06) e epoxiconazol e piraclostrobina (937,50) foram estatisticamente superiores ao tratamento com as duas primeiras aplicações de azoxystrobina e ciproconazol e terceira aplicação com ciproconazol (1.968,75) e a testemunha (2.148,44) (Tabela 1).

Tabela 1 Incidência em porcentagem (%) da cercosporiose (*C. coffeicola*), em folhas, na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica*) em função dos fungicidas aplicados. UFLA, Lavras, MG, 2013

Tratamento	Época de aplicação	AACPIC ⁽¹⁾
Testemunha	-	2148,44 b
Azoxystrobina e flutriafol + epoxiconazol	Dezembro, fevereiro e abril	953,12 a
Azoxystrobina e ciproconazol + ciproconazol	Dezembro, fevereiro e abril	1968,75 b
Ciproconazol e trifloxistrobina	Dezembro, fevereiro e abril	1289,06 a
Epoxiconazol e piraclostrobina	Dezembro e fevereiro	937,50 a
Coeficiente de variação (%)		20,19
Média		1459,37

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); CV (%): coeficiente de variação. AACPD: área abaixo da curva de progresso da incidência da cercosporiose

Durante todo o período de avaliação da cercosporiose em folhas, foram registrados índices entre 22,50% e 7% de incidência (Figura 1).

Observou-se um declínio na incidência até o final do mês de fevereiro, em todos os tratamentos, exceto no tratamento aplicando azoxystrobina e

ciproconazol. Em março ocorreu um aumento significativo da incidência de cercosporiose na testemunha. Os tratamentos pulverizados na segunda pulverização realizada no dia (15/02) mantiveram a tendência de redução até o final do mês de março, demonstrando a eficiência da segunda aplicação dos fungicidas.

No início do mês de abril até o final do período de avaliação, não se observou aumento da doença. Os demais tratamentos apresentaram aumento na incidência. A terceira pulverização, feita no meio do mês de abril (15/04), reduziu o progresso da doença em todos os tratamentos pulverizados, exceto no tratamento quatro, no qual foi aplicado ciproconazol.

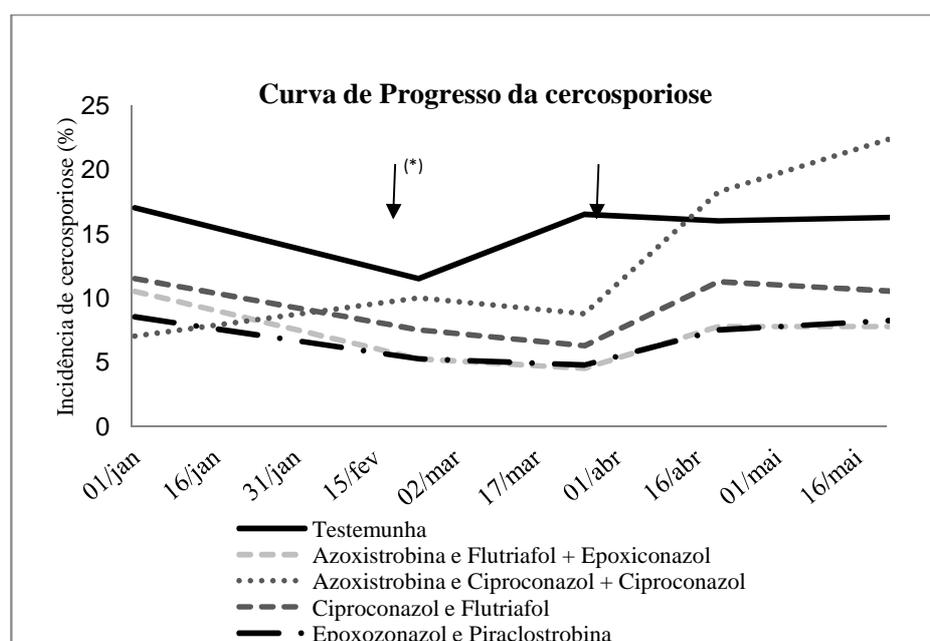


Figura 1 Curva de progresso da incidência da cercosporiose (*C. coffeicola*), em folhas, na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica*), nas diferentes datas de avaliações, em função dos fungicidas aplicados. UFLA, Lavras, MG, 2013.

(*) – Momento das aplicações

Sensibilidade *in vitro* dos ingredientes ativos

O isolado de *C. coffeicola* obtido da área experimental analisada apresentou variação na sensibilidade, quando exposto aos diferentes ingredientes ativos (Figura 2). Nenhuma das variáveis analisadas apresentou evidências de diferença de sensibilidade em relação a grupos químicos. As diferenças encontradas foram em relação ao ingrediente ativo, o que descarta a hipótese de haver resistência cruzada.

Dos ingredientes ativos testados, apenas o ciproconazol apresentou valor de IC₅₀ maior (323,51 ppm) do que a dosagem utilizada em pulverizações em campo comercial (187 ppm). Apenas a piraclostrobina inibiu completamente o crescimento micelial do isolado de *C. coffeicola* na dosagem de campo (400 ppm), com valor de CIM de 374,74 ppm; os demais ingredientes ativos apresentaram valores de CIM superiores às dosagens de campo. De acordo com a ICM, os ingredientes ativos epoxiconazol, piraclostrobina e flutriafol inibiram mais de 75% do crescimento micelial do isolado na dosagem de campo. Os ingredientes azoxystrobina (53,10%) e ciproconazol (36,79%) apresentaram os menores valores de inibição do crescimento micelial.

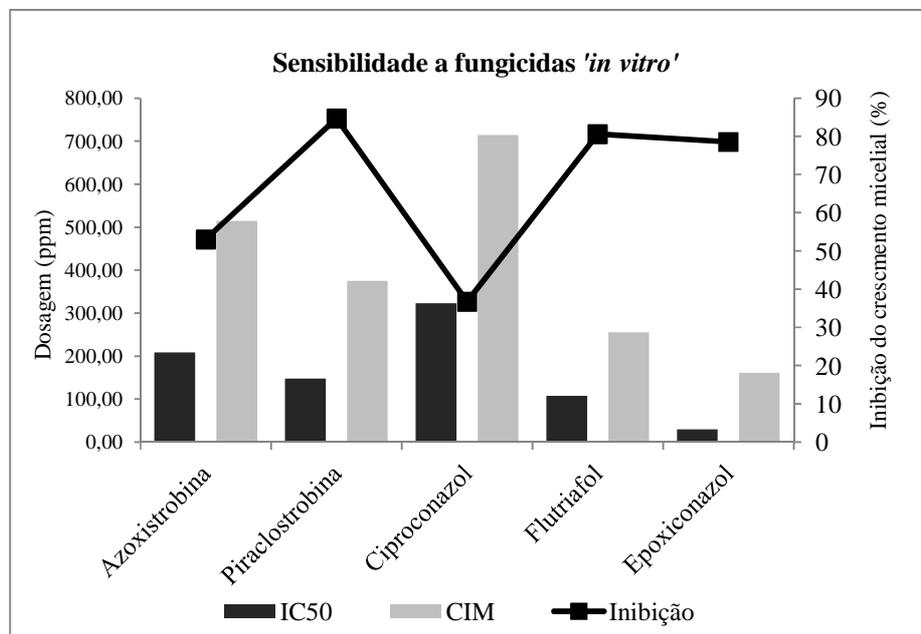


Figura 2 Sensibilidade de *C. coffeicola* a diferentes ingredientes ativos utilizados na cafeicultura. UFLA, Lavras, MG, 2013.

5 DISCUSSÃO

As condições climáticas do experimento *in vivo* foram ideais para a ocorrência da doença, segundo Godoy et al. (1997), com temperaturas variando entre 10 e 25 °C, média de 21,6 °C e umidade relativa média de 73,3%, com pluviosidade total de 1.208,6 mm.

Na análise da curva de progresso da cercosporiose, o aumento da incidência na testemunha a partir de 23/02 pode ser explicado devido às altas temperaturas e a uma maior radiação na copa da planta, aumentando a intensidade luminosa e, conseqüentemente, a produção de cercosporina, determinante de patogenicidade do fungo (Daub et al., 2005). A estabilidade na incidência da cercosporiose a partir do final de março pode ser explicada pela desfolha causada pela doença, pois as folhas com sintomas apresentaram alta queda, diluindo a doença e mantendo, assim, a incidência da doença constante (Pozza et al., 2010). O decréscimo da incidência nos tratamentos 2, 3 e 5, até o final de março (26/03), pode ser explicado pela eficiência dos fungicidas nas duas primeiras aplicações (15/12 e 15/02) e pelo período residual dos mesmos.

Fungicidas do grupo dos DMIs e QoIs são amplamente utilizados na cafeicultura e com eficiência comprovada. Fernandes et al. (2013) afirmam que a mistura comercial dos fungicidas ciproconazol + azoxystrobina, em duas aplicações (janeiro e março), controlou a cercosporiose do cafeeiro com eficiência. De acordo com a análise da AACPDÍ o tratamento 3, mesmo fungicida comercial (azoxystrobina e ciproconazol), mesmo fungicida utilizado por Fernandes et al. (2013), demonstrou baixa eficiência, embora neste estudo tenham sido utilizadas outras épocas de aplicação.

Na análise da curva de progresso observa-se que o tratamento 4 apresenta valores de incidência maiores que o da testemunha, a partir da data da terceira aplicação (15/04), aplicação esta feita somente com ciproconazol neste

tratamento. A ineficiência do tratamento 4 pode ser explicada pela utilização do ingrediente ativo ciproconazol em todas as aplicações, nas duas primeiras aplicações em mistura com azoxystrobina e na terceira aplicação em formulação isolada. Os resultados do experimento *in vitro* comprovaram desempenho dos diferentes tratamentos utilizados no experimento *in vivo*, em que o ciproconazol apresentou resistência para todos os parâmetros avaliados.

No experimento *in vitro*, os ingredientes ativos azoxystrobina, flutriafol, ciproconazol e epoxiconazol apresentaram CIM acima da dosagem utilizada no campo, portanto, segundo a classificação de Yan et al. (2014), o isolado de *C. coffeicola* é altamente resistente a estes ingredientes ativos. Apesar de ser um fungicida do grupo dos QoI, a piraclostrobina foi considerada eficaz. Esta diferença de sensibilidade a fungicidas QoIs já havia sido verificada por Bradley and Pedersen (2011), ao demonstrarem que isolados de *C. zea-maydis* tiveram inibição de germinação de conídios aproximadamente dez vezes maior por piraclostrobin e trifloxystrobin, em comparação com azoxystrobina.

De acordo com os dados de percentual de ICM, o isolado apresentou sensibilidade aos ingredientes ativos piraclostrobina e flutriafol. Aos ingredientes ativos azoxystrobina e epoxiconazol o isolado apresentou baixa resistência e moderada resistência ao ciproconazol, segundo a classificação de Piqueiras et al. (2014). Apenas o ingrediente ativo ciproconazol apresentou valores de IC_{50} maiores do que a dosagem utilizada em campos comerciais, sendo considerado ineficiente (Dube et al., 2014). O resultado na análise de IC_{50} demonstra que o isolado não tem seu desenvolvimento vegetativo afetado significativamente devido ao ciproconazol, ou seja, durante a fase de colonização.

O fato de não terem sido encontradas evidências de resistência cruzada neste trabalho corrobora resultados encontrados por Bolton et al. (2012) que

encontraram variação na presença da resistência cruzada entre as populações *C. beticola* de Minnesota e Dakota do Norte, a fungicidas do grupo dos triazóis.

6 CONCLUSÕES

Dos tratamentos testados no experimento *in vitro*, apenas o tratamento 4, com duas aplicações de azoxistrobina e ciproconazol (dezembro e fevereiro) e a terceira aplicação com ciproconazol (abril) não foi eficiente no controle da cercosporiose, se igualando à testemunha.

A análise da curva de progresso da incidência da cercosporiose do cafeeiro demonstrou que o tratamento com azoxistrobina e ciproconazol (dezembro e fevereiro) e a terceira aplicação com ciproconazol (abril) apresentou valores de incidência superiores ao da testemunha, a partir de abril, evidenciando a possível ineficiência do produto para controle da cercosporiose.

O ciproconazol foi o único ingrediente ativo a apresentar algum grau de resistência pela *C. coffeicola*, para as variáveis IC_{50} , CIM e ICM.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGROFIT, 2014 - Desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>> Acesso em: 20 nov. 2014.
2. Bolton, M.D., et al. "Efficacy of variable tetraconazole rates against *Cercospora beticola* isolates with differing 'in vitro' sensitivities to DMI fungicides." *Plant Disease* 96.12 (2012): 1749-1756.
3. Bradley, C. A., & Pedersen, D. K. Baseline sensitivity of *Cercospora zea-maydis* to quinone outside inhibitor fungicides. *Plant Disease*, 95(2), 189-194 (2011).
4. Brent, K. J., and Hollomon, D. W. 2007. Fungicide Resistance: The Assessment of Risk, second ed. Crop Life International, Brussels.
5. DAUB, M. E. et al. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiology Letters*, London, v. 252, n. 1, p. 197-206, 2005.
6. Dube, J. P., M. Truter, and J. E. van der Waals. "First Report of Resistance to QoI Fungicides in *Alternaria alternata* Isolates from Potato in South Africa." *Plant Disease* 98.10 (2014): 1431-1431.
7. Fernandes, L. H. M., de Resende, M. L. V., Pereira, R. B., Costa, B. H. G., Monteiro, A. C. A., & Júnior, P. M. R. (2013). Acibenzolar-S-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. *Coffee Science*, 8(1), 24-32.
8. Piqueras, C. M.; Herrera, D.; Latorre, B. A. First Report of High Boscalid Resistance in *Botrytis cinerea* associated with the H272L Mutation in Grapevine in Chile. *Plant Disease*, v. 98, n. 10, p. 1441-1441, 2014

9. Pozza, E. A.; Carvalho, V. L.; Chalfoun, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: Guimarães, R. J.; Mendes, A. N. G.; Baliza, D. P. (Ed.). *Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas*. Lavras: UFLA, 2010. p. 69-101.
10. SANTOS, L. A. et al. Nova técnica para isolar *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro. *Coffee Science*, v. 9, n. 1, p. 142-144, 2014.
11. SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mil dewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, v.67, p.1051-1056, 1977.
12. Yan, H. et al. First Report of Pyrimethanil Resistance in *Botrytis cinerea* from Stored Apples in Pennsylvania. *Plant Disease*, n. jan, 2014

ARTIGO 3

Efeito da casugamicina na *Cercospora coffeicola*: fungitoxidade e influência na resistência a DMIs e a QoI

Preparada em concordância com as normas do periódico “**Crop Protection**”
(Versão preliminar)

Santos, L.A; Souza, P.E ; Pozza E. A.; Botelho, D. M. S.; Ribeiro. P. M.
Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Universidade Federal de Lavras /UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP -
Cx. P. 3037 - 37200-000 - Lavras - MG
leandro.alvarenga.s@hotmail.com, pauleste@ufla.br, eapozza@ufla.br

RESUMO: Devido à intensificação de relatos de severas epidemias de mancha-aureolada em cafezais do Brasil e às perdas provocadas por esta doença, pulverizações com casugamicina, único antibiótico registrado para o controle no Brasil, tornaram-se frequentes e, muitas vezes, feitas de forma indevida. Além da mancha-aureolada, outra importante doença que ataca os cafezais é a mancha-do-olho-pardo (*Cercospora coffeicola*). O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o potencial fungitóxico da casugamicina a *C. coffeicola*, a influência da exposição da mesma na alteração da sensibilidade do fungo a fungicidas do grupo dos DMI e QoI, além de sua ação na produção da cercosporina. Foi possível concluir que a casugamicina tem moderada ação fungitóxica ao fungo *C. coffeicola* e que o antibiótico causou a diminuição da síntese da toxina cercosporina, fator de patogenicidade importante em fungos do gênero cercospora. Entretanto, sua utilização em campos comerciais não é recomendada, pois foi observado que a exposição à mesma confere diminuição da sensibilidade à fungicida do grupo dos Triazóis (DMI's).

Palavras-Chaves: Triazóis, Estrobilurinas, Resistência Múltipla, Cafeeiro.

ABSTRACT: Due to the intensification of reports of severe epidemics Haloed Spot in coffee plantations of Brazil and the losses caused by this disease, spray with Kasugamycin, single antibiotic registered for control in Brazil, became frequent and often done improperly. Apart the coffee halo blight another important disease that attacks the coffee plantations is the brown eye stain (*Cercospora coffeicola*). The present study investigated the potential of fungitoxic Kasugamycin *C. coffeicola* the influence of the same exposure in altering the sensitivity of fungi to fungicides group of DMI and QoI, and its action in the production of cercosporin. It was concluded that the Kasugamycin has moderate fungitoxic to the fungus *C. coffeicola* action and that the antibiotic caused the decreased synthesis of cercosporin toxin pathogenicity factor in fungi of the genus *Cercospora*. However its use in commercial fields is not recommended since exposure to it confers decreased sensitivity to group fungicide Triazoles (DMI's).

Key Words: Triazoles, strobilurin, Multiple Resistance, Coffee.

1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de café, respondendo por 35% da produção total. É, ainda, o maior exportador, (aproximadamente 30% do total das exportações) e o segundo maior mercado consumidor (CONAB, 2012). Portanto, a cafeicultura tem grande importância socioeconômica para o país, mas diversos fatores afetam a produtividade do cafeeiro, dentre eles as doenças.

Nos últimos anos, a mancha-aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) ganhou destaque, sendo atribuídas a ela enormes perdas. Periodicamente são publicadas notícias em referência e alerta à grande epidemia que tem sido constatada no Brasil, como matérias em sites de cafeicultura (Cafépoint, 2013) e material de divulgação de agências do governo brasileiro (Procafé, 2013). Tal doença ocorre tanto em mudas no viveiro, como no campo, em plantas adultas (Pozza et al., 2010). Devido à intensificação de relatos de severas epidemias de mancha-aureolada em cafezais do Brasil e às perdas provocadas por esta doença, a utilização de defensivos tem sido a prática mais comum, devido à maior eficiência de controle. Pulverizações com casugamicina, único antibiótico registrado para o controle no Brasil, produtos à base de cobre e misturas com mancozeb, são frequentes e, muitas vezes, feitas de forma indevida.

A casugamicina é um antibiótico/fungicida sistêmico com propriedades tanto protetoras quanto curativas. Foi desenvolvida como fungicida para controlar brusone (*Pyricularia oryzae*), no entanto, por ter modo de ação amplo, inibição da biossíntese de proteínas, seu principal uso tem sido relatado para controle de bacterioses (Psallidas, 2000). No entanto, no Brasil, está registrada também para algumas doenças fúngicas, como a cercosporiose da beterraba, *C. beticola* (AGROFIT, 2014). Devido ao seu uso intensivo, casos de resistência têm sido relatados. McGhee & Sundin (2011) determinaram que a exposição de *Erwinia amylovora* a baixas concentrações de casugamicina aumentou o risco de

desenvolvimento de resistência espontânea. Miura (1975, 1976) verificou falhas no controle de brusone em arroz, descrevendo a ocorrência natural isolados de *P. oryzae* resistentes à casugamicina. Em estudos envolvendo resistência de *P. oryzae* à casugamicina (Sakurai et al., 1975) há relato de que isolados resistentes à casugamicina de *P. oryzae* mostraram resistência cruzada à blasticidina S. e à polyoxin D. Ito e Yamaguchi (1977) afirmam que existe forte probabilidade de resistência múltipla, por haver multigenes envolvidos na resistência à casugamicina.

Neste contexto, as aplicações de casugamicina têm influência no controle de outros patógenos do cafeeiro, entre eles a *Cercospora coffeicola*, agente etiológico da mancha-de-olho-pardo, uma das mais antigas e importantes doenças do cafeeiro. Ela ocorre em folhas, causando manchas e intensa desfolha, seca de ramos e amadurecimento precoce, queda prematura e chochamento de grãos, afetando diretamente o produto comercial (Pozza et al., 2010).

A *C. coffeicola* tem como principal fator de patogenicidade a toxina cercosporina, toxina fotossensibilizadora, do grupo químico das perylenequinonas. O papel da cercosporina na patogenicidade é de tal relevância que, sob sombreamento, ocorre redução do número de lesões em folhas de cafeeiro causadas por *C. coffeicola* (Daub, 2005). Atualmente, no controle desta enfermidade, os fungicidas mais utilizados (38 produtos registrados) são os que têm como ingrediente ativo moléculas do grupo dos triazóis (DMI) e das estrobilurinas (QoI) (AGROFIT, 2014).

Sendo assim, o presente trabalho foi realizado com objetivo de estudar o potencial fungitóxico e a influência da exposição da casugamicina a *C. coffeicola* e na sensibilidade do fungo a fungicidas do grupo dos DMI e QoI, respectivamente, além de sua ação na produção da cercosporina.

2 Material e Métodos

Para o presente estudo, foram selecionados sete isolados de diferentes regiões do Brasil (Tabela 1). A escolha dos isolados foi realizada levando-se em consideração a distribuição da produção de café no país. Por exemplo, o estado de Minas Gerais é responsável por mais de 50% da produção de café do Brasil e, sendo assim, mais da metade dos isolados testados é proveniente deste estado.

Tabela 1 Identificação dos isolados de *C. coffeicola*

Código do Isolado	Localidade
LA 1	MG – Lavras
3P 4	MG – Três Pontas
PIU 2	MG – Piumhi
SFG 1	MG – São Francisco do Glória
BAH 1	BA – São Desidério
ES 3	ES – Alegre
PR 2	PR - Londrina

2.1 Sensibilidade de *C. Coffeicola* à casugamicina

Para avaliar a sensibilidade do fungo *C. coffeicola* à casugamicina, empregaram-se os sete isolados selecionados (Tabela 1). O delineamento experimental instalado foi o de blocos casualizados, com três repetições, constituídos de uma placa de Petri, em esquema fatorial 7x7, em que o primeiro fator foi composto por sete isolados e o segundo fator, por 7 doses do antibiótico (0; 0,1; 1; 10; 30; 60 - dosagem recomendada para pulverização em campo e 120 ppm).

A fusão do antiótico ao meio de cultura malte foi realizada quando este ainda se encontrava em fase líquida, temperatura próxima de 45 °C após autoclavagem. Em seguida, a mistura (meio malte + casugamicina) foi vertida em placas de Petri (10 mL/placa). Após a solidificação do meio, foi depositado,

no centro de cada placa de Petri, um disco de 0,5 cm de diâmetro de micélio de cada um dos isolados de *C. coffeicola*. As placas foram mantidas em incubação, a 25 °C e fotoperíodo, por 7 dias. O experimento foi repetido.

A variável analisada, ao final desse período, foi o crescimento micelial. A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro da colônia em dois eixos ortogonais e, posteriormente, calculando-se a média das duas medidas diametralmente opostas. Os dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) em esquema fatorial, verificando-se o efeito da interação e, posteriormente, para as variáveis significativas, foi realizada a análise de regressão para a determinação da concentração inibitória a 50% (IC₅₀), de cada isolado, de acordo com Chen et al (2013).

2.2 Alteração da sensibilidade a fungicidas (DMI e QoI), após a exposição à casugamicina

Para verificar a alteração da sensibilidade dos isolados, foram montados dois experimentos, um para fungicidas do grupo dos DMIs e outro para fungicidas do grupo dos QoIs. Ambos os experimentos foram instalados em blocos casualizados e esquema fatorial 3x2, sendo o primeiro fator diferentes moléculas, no experimento de DMI (epoxiconazol – 125 ppm, cyproconazol – 200 ppm e tebuconazol – 500 ppm) e no experimento de QoI (picoxistrobina – 200 ppm, azoxystrobina – 250 ppm e piraclostrobina – 400 ppm) e o segundo fator a exposição à casugamicina ou a ausência da mesma. Cada tratamento foi composto de três repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri. A variável avaliada foi o crescimento da colônia aos sete dias, conforme descrito anteriormente. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

Para avaliar a sensibilidade sob ausência da exposição à casugamicina, os isolados foram postos em placas de Petri contendo concentrações dos

fungicidas dos grupos dos DMIs (epoxiconazol – 125 ppm, cyproconazol – 200 ppm, tebuconazol – 500 ppm) e dos QoIs (picoxistrobina – 200 ppm, azoxystrobina – 250 ppm e piraclostrobina – 400 ppm) nas doses recomendadas para pulverização em campo.

Ao mesmo tempo, para avaliar a sensibilidade após a exposição à casugamicina, os isolados foram postos para crescer em meios contendo o antibiótico em concentração usada em campo (60 ppm). Após 15 dias, quando as colônias atingiram o tamanho necessário, discos de micélios de 0,5 cm foram retirados da região de crescimento ativo e colocados em meio malte contendo os fungicidas nas mesmas concentrações, avaliando-se, aos sete dias, o crescimento da colônia.

Os dados do tamanho das colônias dos isolados expostos somente aos fungicidas e os isolados expostos à casugamicina e, posteriormente, aos fungicidas, foram comparados, realizando-se uma relação entre o crescimento de ambos (Equação 1), seguida da análise de variância ($p < 0,05$) com avaliação da interação. Quando verificado o efeito da interação entre isolados expostos à casugamicina e os não expostos, realizou-se teste de médias Scott-Knott (0,05).

$$R_c = \left(\frac{C_k \times 100}{\bar{x}C_f} \right) \quad \text{(Equação 1)}$$

R_c = Relação de crescimento

$\bar{x}C_f$ = Média do crescimento do isolado e meio contendo fungicida

C_k = Crescimento do isolado em média contendo fungicida após a exposição à casugamicina

Para a apresentação dos dados foi subtraído o valor de 100, para facilitar a interpretação dos resultados, sendo

- se $R_c < 0$, tem-se aumento da sensibilidade ao fungicida após a exposição à casugamicina;

- se $R_c > 0$, tem-se diminuição da sensibilidade ao fungicida após a exposição à casugamicina.

2.3 Produção de cercosporina

Para a análise de produção de cercosporina, cultivaram-se os isolados monospóricos em meio malte com diferentes concentrações da casugamicina. O delineamento experimental empregado foi o de blocos casualizados, com três repetições, constituída de uma placa de Petri, em esquema fatorial 7x4, em que o primeiro fator foi composto por sete isolados e o segundo fator, por quatro doses do antibiótico (0; 0,1; 1; 10).

Dosagens superiores do antibiótico inibiram o crescimento micelial da colônia, impedindo a obtenção de discos de micélio em número suficiente para a análise da toxina.

Os isolados monospóricos cultivados nas diferentes concentrações da casugamicina foram mantidos, por um período de 15 dias, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 15 dias, a partir das bordas das colônias, extraíram-se três discos de micélio (5 mm de diâmetro), os quais foram imersos em 8 mL de KOH 5N, por 4 horas, no escuro, para a extração da cercosporina (Jenns et al., 1989).

A variável analisada foi o valor da absorbância dos extratos em espectrofotômetro. A concentração da toxina no extrato foi estimada por coeficiente de extinção molar de 23.300 para leituras de A480 nm (Jenns et al., 1989). Para determinar a produção de cercosporina por disco, dividiu-se o resultado por três. Os dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$)

em esquema fatorial. Verificando-se o efeito da interação entre isolados e doses, foi realizada a análise de regressão de cada isolado.

3 Resultado

3.1 Sensibilidade

3.1.1 Sensibilidade dos isolados de *C. coffeicola* à casugamicina

De acordo com a análise de variância, os dados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), ocorrendo interação significativa entre os fatores doses de casugamicina e isolados. Na análise de regressão, ajustaram-se modelos quadráticos para todos os isolados, com valores de r^2 entre 0,77 e 0,92 (Fig 1). Analisando-se as curvas é possível constatar que todos os isolados apresentaram o mesmo comportamento; com o aumento da dose de casugamicina ocorreu a diminuição do diâmetro da colônia de *C. coffeicola*. Entretanto, a inibição completa de *C. coffeicola* não foi observada em nenhum dos isolados testados.

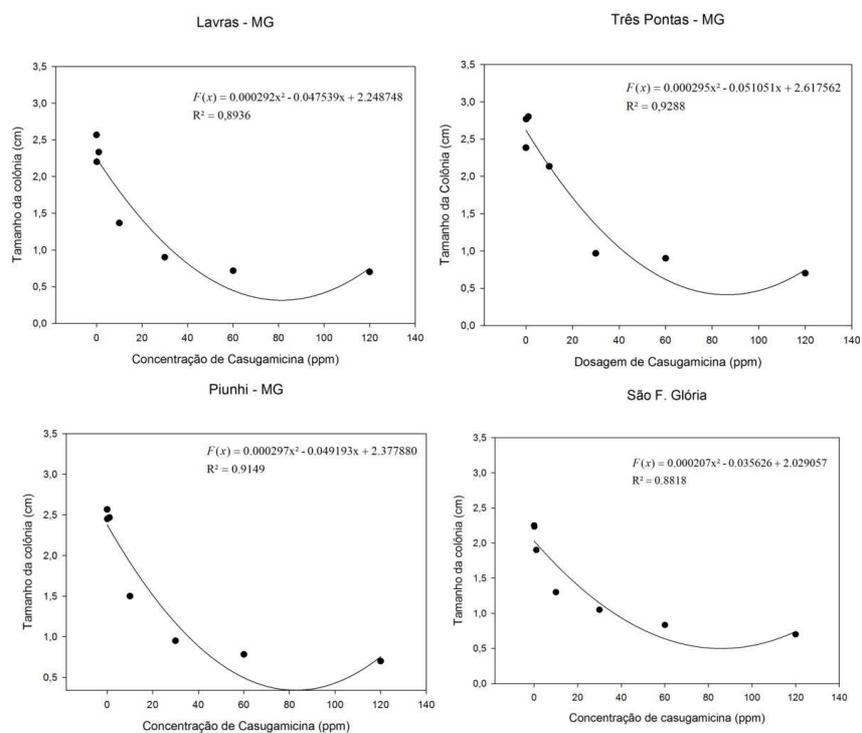
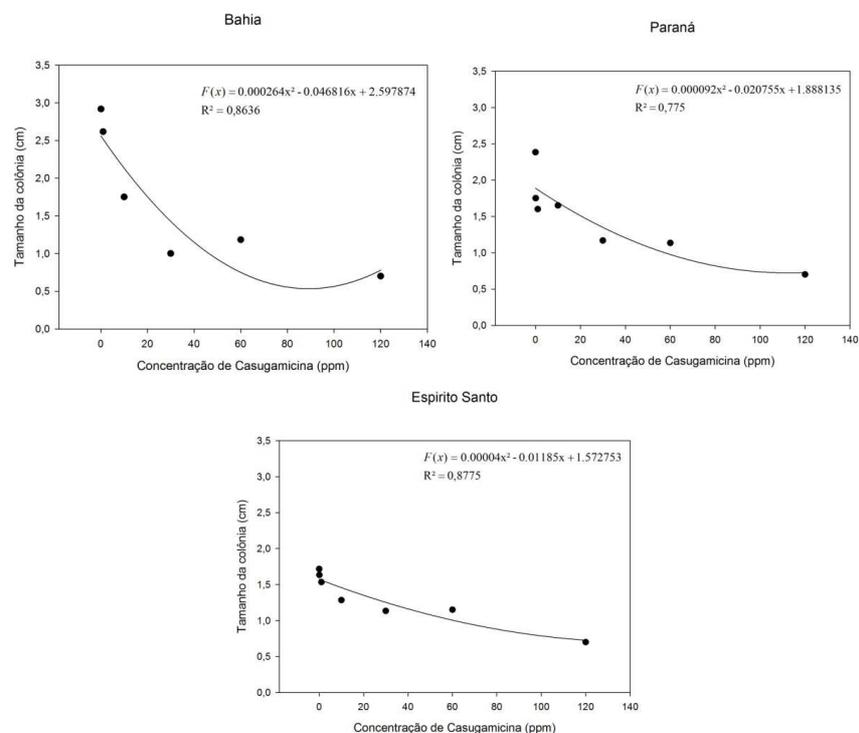


Figura 1 Crescimento micelial de isolados de *C. coffeicola* em meio de cultura contendo diferentes dosagens de casugamicina. UFLA, Lavras, MG, 2013

(...continua...)



3.1.2 Concentração inibitória - IC₅₀

Os valores de IC₅₀ dos isolados testados apresentaram uma variação de aproximadamente 345%. Os valores de IC₅₀ (Fig 3) dos isolados pertencentes ao estado de Minas e da Bahia (Lavras - 30,06; Três Pontas - 32,81; Piumhi - 30,72; São Francisco da Glória - 37,46 e São Desidério - 35,99 ppm) apresentaram valores abaixo dose utilizada em campo (60 ppm). Nos estados do Espírito Santo (103,04 ppm) e Paraná (63,80 ppm), a dose inibitória foi superior à recomendada, demonstrado que existe uma variabilidade espacial em relação à sensibilidade de *C. coffeicola* à casugamicina.

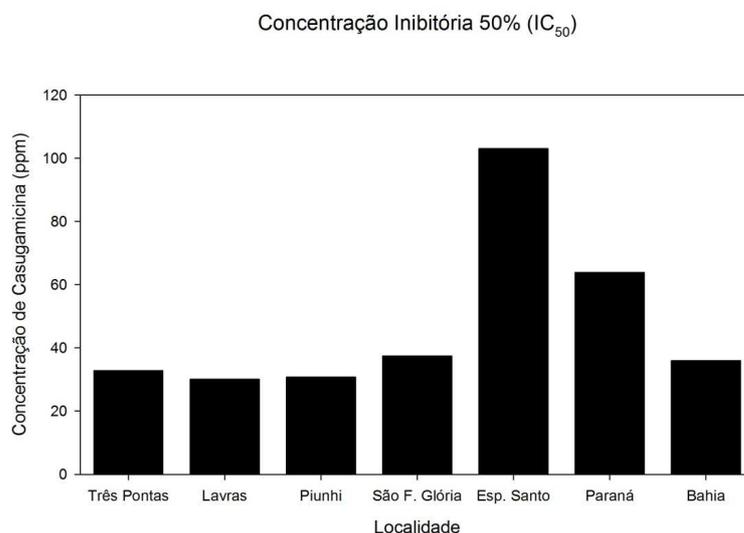


Figura 3 Valores do IC₅₀ de casugamicina dos isolados de *C. coffeicola*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

3.2 Resistência

3.2.1 Resistência a DMI

A análise de variância apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ocorrendo interação entre os fungicidas e os isolados. No desdobramento da interação, o fungicida tebuconazol não apresentou significância, assim como os isolados de Piunhi e do Paraná (Tab. 3).

O resultado da Rc demonstra que, após a exposição ao antibiótico, todos os isolados apresentaram diminuição da sensibilidade aos fungicidas DMIs ($R_c > 0$). Em relação ao cyproconazol, o isolado da Bahia apresentou maior perda de sensibilidade (136,67%), precedido por isolados de Lavras (96,08%) e São Francisco da Glória (96,97%). A menor perda de sensibilidade foi constatada no isolado do Espírito Santo (29,17%).

Para o epoxiconazol, a maior perda de sensibilidade foi do isolado de Três Pontas (56,92%). Para ambos os DMIs que apresentaram significância, a menor perda foi para o isolado do Espírito Santo, 29,17% para o cyproconazol e 7,46% para o epoxiconazol. Pode-se inferir que essa menor redução de sensibilidade seja devido à variação da planta hospedeira da qual este isolado foi obtido, *Coffea canephora*.

Tabela 3 Relação de crescimento micelial (%) dos isolados de *C. coffeicola* a moléculas de fungicidas DMI, perante a exposição à casugamicina. UFLA, Lavras, MG, 2013

Isolados ^(*)	Fungicidas					
	Cyproconazol		Epoxiconazol		Tebuconazol ^(NS)	
Três Pontas	50,00	b B	56,92	b B	3,33	a A
Bahia	136,67	d C	25,00	a B	6,67	a A
Espírito Santo	29,17	a B	7,46	a A	6,67	a A
Lavras	96,08	c B	11,96	a A	0,00	a A
Piumhi ^(NS)	14,29	a A	20,90	a A	13,33	a A
Paraná ^(NS)	23,26	a A	11,11	a A	0,00	a A
São F. da Glória	96,97	c C	23,21	a B	0,00	a A
Cv (%): 8,03		Média geral: 130,14			Desvio padrão: 37,62	

Letra maiúscula na linha e minúscula na coluna

NS – Não significativo, ao teste de Scott Knott a 0,05.

(*) – Considerou-se o crescimento dos isolado de referencia como 0%

3.2.2 Resistência a QoI

A análise de variância apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ocorrendo interação entre os fungicidas e os isolados. No desdobramento da interação, o isolado da Bahia não apresentou significância (Tab. 4).

O resultado da Rc demonstra grande variação da sensibilidade entre isolados aos fungicidas após exposição ao antibiótico ($Rc > 0$ e $Rc < 0$). Todos os isolados que apresentaram significância no desdobramento após a exposição à

casugamicina tiveram sua sensibilidade à azoxtrobina aumentada ($R_c < 0$), tendo os isolados do Paraná (-20,37) e o isolado de São F. da Glória (-13,04) apresentado os maiores aumentos de sensibilidade.

O isolado de Piumhi apresentou aumento da sensibilidade a todos os fungicidas do grupo dos QoI testados após a exposição à casugamicina, juntamente com o isolado de Três Pontas (-21,31%), sendo os que tiveram maior aumento de sensibilidade à piraclostrobina. O isolado de Lavras apresentou o maior aumento de sensibilidade (-54,55%), dentre os testados para picoxistrobina, enquanto o isolado de São Francisco da Glória apresentou redução da sensibilidade (9,26%) após a exposição à casugamicina.

Tabela 4 Relação de crescimento micelial dos isolados de *C. coffeicola* a moléculas de fungicidas QoI perante a exposição à casugamicina. UFLA, Lavras, MG, 2013

Isolados (*)	Fungicidas								
	Azoxistrobina			Picoxistrobina			Piraclostrobina		
Três Pontas	-0,52	b	B	0,92	c	B	-21,31	a	A
Bahia (NS)	3,95	b	A	-5,80	b	A	1,39	b	A
Espírito Santo	-1,45	b	A	-9,68	b	A	9,52	b	B
Lavras	-7,55	b	B	-54,55	a	A	6,67	b	C
Piumhi	-4,10	b	B	-12,40	b	B	-23,08	a	A
Paraná	-20,37	a	A	-12,96	b	A	6,38	b	B
São F. da Glória	-13,04	a	A	9,26	c	B	30,43	c	C
	Cv (%): 8,97			Média Geral: 94,36			Desvio Padrão: 17,84		

Letra maiúscula na linha e minúscula na coluna

NS – Não significativo, ao teste de Scott Knott, a 0,05.

(*) – Considerou-se o crescimento dos isolado de referencia como 0%

3.3 Cercosporina

Todos os isolados apresentaram produção de cercosporina. A análise de variância apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Ocorrendo interação significativa entre os fatores doses de casugamicina e isolados, para a variável concentração de cercosporina, exceto para o isolado proveniente de São Francisco da Glória. Na análise de regressão ajustaram-se modelos quadráticos para todos os isolados, com valores de r^2 entre 0,15 e 0,99 (Tab 5).

Observou-se o efeito de inibição da síntese da toxina ao incremento da casugamicina; quanto maior a dose do antibiótico, menor a produção de cercosporina. No entanto, não foi observada ausência da síntese da toxina em nenhuma das dosagens testadas em nenhum dos isolados analisados.

Tabela 5 Equações de regressão e coeficientes de determinação (r^2) da concentração de cercosporina nas diferentes doses de casugamicina. UFLA, Lavras, MG, 2013

Isolado	r^2	Equação
Três Pontas	0,55	$0,018x^2 - 0,201x + 0,278$
Bahia	0,65	$0,016x^2 - 0,175x + 0,18$
Espírito Santo	0,88	$0,008x^2 - 0,09x + 0,242$
Lavras	0,57	$0,025x^2 - 0,281x + 0,222$
Piumhi	0,15	$0,011x^2 - 0,119x + 0,222$
Paraná	0,99	$0,002x^2 + 0,023x + 0,019$
São Francisco da Glória ^(NS)	0,97	$0,005x^2 + 0,047x - 0,026$
Cv (%): 23, 21		Desvio padrão: 0,12

4 Discussão

4.1 Sensibilidade

A atividade fungitóxica apresentada pela casugamicina sobre a *C. coffeicola* deriva do seu modo de ação. A casugamicina inibe a biossíntese de proteínas, interferindo na iniciação do processo de tradução, impedindo, assim, a incorporação de aminoácidos em proteínas (Schuwirth, 2006). Na literatura está

descrita a ação da casugamicina inibindo o crescimento de hifas de *P. oryzae* em arroz e prevenindo o desenvolvimento de lesões, que é um fator de inibição da germinação dos esporos, formação de apressório e penetração nas células epidérmicas (Hamada, 1965).

Por agir em um sítio de ação comum a muitos organismos, biossíntese de proteínas, a molécula tem amplo espectro de ação. Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que a casugamicina tem atividade antifúngica sobre a *C. coffeicola* (Fig 2), embora os altos valores IC_{50} obtidos (Fig 3) indiquem moderada toxicidade (Edgington, 1971).

O maior valor de IC_{50} encontrado neste trabalho refere-se ao isolado proveniente do estado do Espírito Santo. Além da variação espacial, outro fator a ser considerado para uma possível explicação refere-se ao hospedeiro. Dentre todos os isolados analisados da planta hospedeira, este foi o único obtido de *Coffea canephora* e não de *C. arabica*.

4.2 Resistência

Casos de resistência de fungos à casugamicina foram relatados, o primeiro deles foi a *P. oryzae* (Ohmori et al, 1967; Uesugi et al, 1969). Há muito se estuda a resistência de organismos fungicos à casugamicina, entretanto, o ineditismo de presente estudo se deve à perspectiva de correlacionar a exposição da casugamicina à alteração da sensibilidade de *C. coffeicola* a outras moléculas, possível resistência múltipla.

Ito & Yamaguchi (1977) constataram diferentes graus de resistência à casugamicina a *P. oryzae*, sugerindo que tal mecanismo de resistência é controlado por mais de um gene, o que implicaria em ocorrência de possível resistência quantitativa e, portanto, multigênica. Esta hipótese foi confirmada por Taga (1978), ao descobrir três loci gênicos ligados à resistência de *P. oryzae*

à casugamicina. Baseado nisto, a diminuição da sensibilidade dos isolados de *C. coffeicola* a fungicidas do grupo dos DMIs, após a exposição à casugamicina (Tab 3), demonstra uma possível resistência múltipla entre casugamicina e fungicidas DMIs, os quais são amplamente utilizados para controle da mancha-do-olho-pardo no campo (Patrício et al, 2008). Estudos futuros são necessários para maior compreensão desta possível resistência múltipla.

Comportamento diferente foi observado em relação aos fungicidas do grupo do QoI, em que se observou variação no comportamento dos isolados em relação aos diferentes fungicidas utilizados.

4.3 Cercosporina

Outra variável analisada foi a atuação da casugamicina na produção da cercosporina. A casugamicina atuou afetando a produção de cercosporina, contrariando o descrito por Martins (2007) que afirma que, naturalmente, a concentração de cercosporina tem correlação negativa com o tamanho das colônias de *C. coffeicola* cultivadas *in vitro*. No presente trabalho, observou-se que baixas dosagens de casugamicina proporcionaram maiores diâmetros de colônia e maiores concentrações da toxina.

Sobre a biossíntese da cercosporina sabe-se que a mesma é regulada em uma complexa e hierarquizada ordem de fatores, que incluem condições de nutrientes, temperatura e luz, sendo este o primeiro sinal para o início da biossíntese (Daub & Ehrenshaft, 2000). A atuação da casugamicina reduzindo a concentração de cercosporina provavelmente está ligada às inibições da síntese de enzimas que participam na rota metabólica de biossíntese da toxina.

O papel da cercosporina na patogenicidade de fungos do gênero *Cercospora* tem sido demonstrado em outros patosistemas. Almeida et al. (2005) observaram que a diferença de virulência entre os isolados de *Cercospora*

kikuchii foi associada ao conteúdo cercosporina. Análise de virulência realizada com quatro isolados com diferentes capacidades para a síntese cercosporina demonstrou que todos os isolados foram capazes de infectar folhas de soja, e que havia um coeficiente de correlação de 83% entre o conteúdo de cercosporina e a severidade da doença. A diminuição da concentração de cercosporina mediante o aumento da concentração de casugamicina indica que a sua ação sobre o fungo se dá de forma direta, por meio da inibição do crescimento micelial, afetando a patogenicidade dos isolados e diminuindo o teor de cercosporina.

5 Conclusão

No presente estudo foi possível concluir que a casugamicina tem moderada ação fungitóxicas ao fungo *C. coffeicola*.

Outra ação da casugamicina sobre este patógeno é a redução da síntese da toxina cercosporina, fator de patogenicidade importante em fungos do gênero cercospora.

Entretanto, sua utilização em campos comerciais deve ser evitada, visto que a exposição à mesma confere diminuição da sensibilidade a fungicidas do grupo dos triazóis (DMIs).

6 Referências Bibliográficas

AGROFIT, 2014 - Desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>> Acesso em: 20 nov. 2014.

Almeida, A. M. R et al. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, n. 6, p. 594-602, 2005.

CAFÉ POINT, acessado em dezembro de 2014: <http://www.cafepoint.com.br/radares-tecnicos/folha-procafe/preocupacao-dos-cafeicultores-mancha-aureolada-e-tema-de-palestra-de-pesquisadora-do-instituto-biologico-de-campinas-86234n.aspx>

Chen, F., et al. "Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both Propiconazole and Boscalid." *Plant Disease* 97.5 (2013): 645-651.

CONAB, acessado em dezembro de 2014: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_17_09_29_46_bol_etim_cafe_-_original_normalizado.pdf

Daub, M. E. & Ehrenshaft, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. Annual Review of Phytopathology 38:461-490. 2000.

Daub, M. E.; Herrero, S.; Chung, K.. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. FEMS microbiology letters, v. 252, n. 2, p. 197-206, 2005.

Edgington, L. V.; Khew, K. L.; Barron, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology, Sant Paul, v.61, p.42-44, 1971.

Fernández-Ortuño, Dolores, Fengping Chen, and Guido Schnabel. "Resistance to Cyprodinil and Lack of Fludioxonil Resistance in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry in North and South Carolina." *Plant Disease* 97.1 (2013): 81-85.

Ito, H., and T. Yamaguchi. 1977. Occurrence of kasugamycin resistant rice blast fungus influenced by the application of fungicides. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 43:301-303.

Jenns, A. E., Daub, M.E. & Upchurch, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. Phytopathology 79:213-219. 1989.

M. Hamada, T. Hashimoto, S. Takahashi, M. Yoneyama, T. Miyake, Y. Takeuchi, Y. Okami, H. Umezawa, Antimicrobial activity of kasugamycin, J. Antibiotics. Ser. A 18 (1965) 104–106.

Martins, Ricardo Brainer. Variabilidade de *Cercospora coffeicola* em Minas Gerais com base em compatibilidade vegetativa e produção de cercosporina. 2007 (TESE).

Mcghee, Gayle C.; Sundin, George W. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, v. 101, n. 2, p. 192-204, 2011.

Miura, H., H. Ito, and S. Takahashi. 1975. Resistant strains of *Pyricularia oryzae* to kasugamycin as a cause of diminished fungicidal activity to rice blast. *Ann. Phytopathol. Soc. Japn.* 41:415-417. (in Japanese with English summary).

Miura, H., M. Katagiri, T. Yamaguchi, Y. Uesughi, and H. Ito. 1976. Mode of occurrence of kasugamycin resistant rice blast fungus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 42:117-123.

Ohmori, K. 1967. Studies on characters of *Pyricularia oryzae* made resistant to kasugamycin. *J. Antibiotics* v. 20:109-114.

Patrício, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. *Annals of applied biology*, v. 152, n. 1, p. 29-39, 2008.

Pozza, E. A.; Carvalho, L. V.; Chalfoun, S. M. Sintomas e injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: Guimarães, R. J.; Mendes, A. N. G.; Baliza, D. P. (Ed.). *Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas*. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.

PRÓ-CAFÉ, Online, acessado em dezembro de 2014: <http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php/index.php?tipo=ler&mat=51472&preocupacao-dos-cafeicultores--mancha-aureolada-e-tema-de-palestra-de-pesquisadora-do-instituto-biologico-de-campinas-.html>

Psallidas, Peter G. et al. Chemical control of fire blight. *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, p. 199-234, 2000.

Schuwirth, B. S. et al. Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation. *Nature structural & molecular biology*, v. 13, n. 10, p. 879-886, 2006.

Taga, M. et al. Identification of three different loci controlling kasugamycin resistance in *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, v. 69, p. 463-466, 1979.

Uesugi, Y., M. Katagiri, and K. Fukunaga. 1969. Resistance in *Pyricularia oryzae* to antibiotics and organophosphorus fungicides. *Bull. Nat. Inst. Agric. Sci. Tokyo*. V. 23:93-112. (in Japanese, with English summary)