



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SHEILA ARIANA XAVIER VALENCIO

**MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA AVALIAR A
SENSIBILIDADE DE *Corynespora cassicola* e
Colletotrichum spp. A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO
DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.**

Londrina
2017

SHEILA ARIANA XAVIER VALENCIO

**MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA AVALIAR A
SENSIBILIDADE DE *Corynespora cassicola* e
Colletotrichum spp. A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO
DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Giovanetti
Canteri

Co-Orientador(a): Dra. Cláudia Vieira Godoy

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Valencio , Sheila Ariana Xavier.

Microtitulação colorimétrica para avaliar a sensibilidade de *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* spp. a fungicidas e caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. / Sheila Ariana Xavier Valencio . - Londrina, 2017.
101 f. : il.

Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri.

Coorientador: Cláudia Vieira Godoy.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Antracnose - Tese. 2. CE50 - Tese. 3. Mancha-alvo e resistência a fungicidas - Tese. I. Canteri, Marcelo Giovanetti . II. Godoy, Cláudia Vieira . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

SHEILA ARIANA XAVIER VALENCIO

**MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA AVALIAR A
SENSIBILIDADE DE *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* spp.
A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Maria Isabel Balbi-Peña
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Débora Cristina Santiago
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Rafael Moreira Soares
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
EMBRAPA

Dr. Adriano Augusto de Paiva Custodio
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Londrina, 16 de fevereiro de 2017.

Aos meus pais Ivanilda Cardose de Souza e Silvio Xavier (*in memoriam*) que não mediram esforços pra me ajudar em todos os momentos. Aos meus filhos Miguel e Davi, que extraem o melhor que existe em mim e ao meu marido e companheiro incondicional Wanderson. Vocês são a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo grande incentivo que deram aos meus estudos, e pelas orações, torcidas, apoio e aconchego.

Ao meu pai Silvio (*in memoriam*), por ser um exemplo de caráter, pessoa amorosa, esforçada, que mesmo diante de tantas lutas se faz presente em todos os momentos e sempre colocou a família em primeiro lugar, me deixou várias lições de vida, a qual tento seguir a cada dia. A minha mãe Ivanilda pelo grande incentivo e por não medir esforços em me ajudar em tudo que eu preciso e por me ajudar até nas coisas que eu acho que não preciso.

Ao amado Wanderson que me ajuda em tudo que faço, por ser paciente nos meus momentos de estresse, por saber multiplicar a alegria de cada momento, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, por ser uma pessoa linda, admirável, companheira com quem divido meus momentos tristes e felizes e principalmente pela família linda que juntos formamos.

Aos meus filhos Miguel e Davi, que são minha herança, minhas fortalezas, meus verdadeiros amores, minha vontade de querer construir um mundo cada dia melhor, meus maiores incentivos para dar o melhor de mim em tudo que faço, pois sei que serei o exemplo da vida deles.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo G. Canteri por todos os anos de orientação, paciência, compreensão e amizade. Pela confiança que sempre depositou em mim, por todas as coisas que me ensinou durante minha longa trajetória e pelo exemplo de professor e pesquisador que veio facilitar a escolha para meu futuro profissional.

A minha co-orientadora Dra. Cláudia Vieira Godoy, um exemplo de pessoa determinada, eficiente, inteligente, amorosa e amiga. Pelos valiosos conselhos de vida, pela ajuda e compreensão em todos os momentos, pelas excelentes orientações e pelos ensinamentos, por ser um exemplo de profissional a ser seguido, enfim, por ser uma orientadora impecável.

A pesquisadora Dra. Ivani de Oliveira Negrão Lopes, por toda ajuda com a estatística do trabalho, por ser tão animada e atenciosa e não medir esforços para me ouvir, compreender e ajudar.

A estagiária Helen, por todo esforço e empenho dedicado nos trabalhos que conduzimos juntos. A amiga Lilian, por ser tão prestativa e me socorrer com as impressões.

A amiga Lucimara por sempre me ensinar tudo o que sabe, facilitar meu caminho, pelas indicações, pela experiência prática que me proporcionou na área de fitopatologia e acima de tudo pelo carinho e confiança em meu trabalho.

Aos amigos do laboratório, Allan, Gisele, Alda, Sergio e Luiz, pelo companheirismo e pela imensa ajuda, que fez tornar tudo mais fácil. A amiga de sempre, Josiane, que sempre esteve ao meu lado, fazendo parte de todos os momentos importantes de minha vida, pelas conversas, desabafos, conselhos e especialmente pela amizade sincera.

E em especial a Deus que sempre está ao meu lado e permitiu a realização de mais um sonho... “Não tenho palavras pra agradecer tua bondade, dia após dia me cercas com fidelidade, nunca me deixe esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser, vem de ti Senhor”.

Porque eu bem sei os pensamentos que tenho a vosso respeito, diz o SENHOR; pensamentos de paz, e não de mal, para vos dar o fim que esperais.

Jeremias 29:11

XAVIER-VALENCIO, S. A. **Microtitulação colorimétrica para avaliar a sensibilidade de *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* spp. a fungicidas e caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp.** 2017. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Os trabalhos de monitoramento de resistência a fungicidas fornecem informações importantes para definir estratégias de manejo de doenças e evitar aplicações desnecessárias de fungicidas. O objetivo do trabalho foi: i) Avaliar a eficiência do método de microtitulação colorimétrica para determinar a sensibilidade do fungo *Corynespora cassiicola* e realizar o monitoramento da sensibilidade a fungicidas inibidores da desmetilação (IDM), metil benzimidazol carbamato (MBC) e inibidores da quinona oxidase (IQo); ii) Realizar a caracterização morfológica e patogenicidade de espécies do fungo *Colletotrichum* spp. isolados de plantas de soja e o monitoramento da sensibilidade do fungo aos fungicidas IDM, MBC e IQo. Para avaliar a eficiência do método de microtitulação colorimétrica foi comparado os valores de CE₅₀ (concentração efetiva para reduzir metade do crescimento da colônia do fungo) para isolados de *C. cassiicola*, obtidos pelo método de inibição de crescimento micelial, com valores obtidos pelo método de microtitulação. Os valores de CE₅₀ obtidos pelo método de microtitulação apresentaram correlação de 0,90 e 0,88 com os valores obtidos pelo método de crescimento micelial, para carbendazim e protioconazol, respectivamente. No monitoramento da sensibilidade as CE₅₀ para *C. cassiicola* para carbendazim (MBC) variaram de 0,0045 a 14,27 µg mL⁻¹ e 0,69 a 2,66 µg mL⁻¹, respectivamente para os isolados do PR e MT; para piraclostrobina (IQo) variaram de 4,17 a 44,91 µg mL⁻¹ e 0,29 a 20,43 µg mL⁻¹, respectivamente, para os isolados do PR e MT; para o protioconazol (IDM) variaram de 0,0033 a 45,11 µg mL⁻¹ (média 4,84 µg mL⁻¹) e 0,0044 a 17,70 µg mL⁻¹ (média 1,90 µg mL⁻¹) para os isolados do PR e MT, respectivamente. Na análise morfológica dos isolados de *Colletotrichum* spp., foi avaliada o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM); coloração da colônia, borda e reverso da colônia em meio de cultura BDA; presença de peritécio, acérvulo e massa conidial; tamanho e forma dos esporos classificadas em agudo, arredondado e clavado; e severidade em folhas de soja destacadas. Os 87 isolados de *Colletotrichum* spp., foram classificados como pertencentes a espécie *Glomerella glycines* ou a fase anamórfica *C. truncatum* ou, destes 29 foram patogênicos a soja. Análise de agrupamento de dados separou os isolados em 15 e 16 grupos para o experimento 1 e 2 respectivamente, não sendo possível uma diferenciação dos isolados de *Colletotrichum* spp., como patogênico ou não patogênico a soja, levando em consideração apenas os atributos qualitativos e quantitativos avaliados. Os isolados patogênicos foram utilizados no teste de monitoramento de sensibilidade. As CE₅₀s para *C. truncatum* variaram de 1,89 a 2,93 µg mL⁻¹ para carbendazim (MBC); de 0,36 a 5,39 µg mL⁻¹ para piraclostrobina (IQo) e de 0,051 a 4,67 µg mL⁻¹ (média 1,39 µg mL⁻¹) para protioconazol (IDM).

Palavras-chave: Antracnose. CE₅₀. Mancha-alvo e resistência a fungicidas.

XAVIER-VALENCIO, S. A. **Colorimetric microtiter method to evaluate the sensitivity of *Corynespora cassiicola* and *Colletotrichum* spp. toward fungicides and characterization of isolates of *Colletotrichum* spp.** 2017. Doctoral Thesis in Agronomy – State University of Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The sensitivity monitoring to fungicides provide important information to define disease management strategies and avoid unnecessary fungicide applications. The objectives of this study were: i) evaluate the efficiency of the colorimetric microtiter method to determine the sensitivity of the fungus *Corynespora cassiicola* and perform sensitivity monitoring of fungus toward demethylation inhibitors (DMI), methyl benzimidazole carbamates (MBC) and the quinone outside inhibitors (QoI) fungicides; ii) Perform morphological characterization and pathogenicity of fungus *Colletotrichum* spp. species isolated from soybean plants and the sensitivity monitoring of fungi toward fungicides DMI, MBC and QoI. To evaluate the efficiency of the colorimetric microtiter method was compared EC₅₀ values (half-maximal effective concentration) to isolates of *C. cassiicola* obtained by mycelial inhibition growth method with values obtained by microtiter method. The EC₅₀ obtained by microtiter method presented a correlation of 0.90 and 0.88 ($p < 0.05$) with values obtained by mycelial inhibition growth assay for carbendazim and prothioconazole, respectively. On sensitivity monitoring the EC₅₀s of *C. cassiicola* for carbendazim (MBC) ranged from 0.0045 to 14.27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.69 to 2.66 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively for the isolated collected in PR and MT; for pyraclostrobin (QoI) ranged from 4.17 to 44.91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.29 to 20.43 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, for isolates of PR and MT; for prothioconazole (DMI) ranged from 0.0033 to 45.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean 4.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and 0.0044 to 17.70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (median 1.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for isolates of PR and MT, respectively. In the morphological analysis of the isolates *Colletotrichum* spp., the mycelial growth rate index (IVCM) was evaluated; colors, border and reverse colony staining in PDA culture medium; presence of perithecium, acervulum and conidial mass; size and shape of the spores classified as acute, rounded and curved; and severity in leaves highlighted. The 87 isolates of *Colletotrichum* were classified as belonging to *Glomerella glycines* species or the anamorphic *C. truncatum*, these 29 were pathogenic to soybean. Data cluster analysis separates the isolates in 15 and 16 groups for experiment 1 and 2 respectively, and it is not possible to differentiate the isolates of *Colletotrichum* spp. as pathogenic or non pathogenic to soybean, taking into account their own qualitative and quantitative attributes. Only pathogenic isolates were used in the sensitivity monitoring test. The CE50s for *C. truncatum* ranged from 1.89 to 12.93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for carbendazim (MBC); 0.36 to 5.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for pyraclostrobin (IQo) and 0.051 to 4.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean 1.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for prothioconazole (MDI).

Key words: Anthracnose. EC₅₀. Target spot and resistance to fungicides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 – Dendrograma do agrupamento de dados pelo método SINGLE, considerando os atributos quantitativos e qualitativos, para os isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. Londrina, 2017	87
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola* presentes na Micoteca da Embrapa Soja (MES), ano e local de isolamento, e concentração efetiva de carbendazim e protioconazol para reduzir 50% do crescimento (CE_{50} - $\mu\text{g mL}^{-1}$) pelo método de microtitulação colorimétrica. Londrina, 201740
- Tabela 3.2** – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} - $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 201748
- Tabela 4.1** – Código de identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp., ano e local de coleta dos isolados. Londrina, 201767
- Tabela 4.2** – Código e características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no presente estudo. Londrina, 201768
- Tabela 4.3** – Código de identificação dos isolados de *Colletotrichum truncatum*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} - $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 201774

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	IMPORTÂNCIA DA SOJA	16
2.2	MANCHA-ALVO.....	18
2.2.1	Danos.....	19
2.2.2	Controle Químico	20
2.3	ANTRACNOSE	21
2.3.1	Danos.....	24
2.3.2	Controle Químico	24
2.4	FUNGITOXICIDADE E SENSIBILIDADE DE PATÓGENOS	25
2.5	RESISTÊNCIA DE FUNGOS A FUNGICIDAS	27
3	Artigo A - Método de microtitulação colorimétrica para determinar a sensibilidade do fungo <i>Corynespora cassicola</i> a fungicidas e o monitoramento da sensibilidade do fungo à inibidores da desmetilação, metil benzimidazol carbamato e inibidores da quinona oxidase	30
3.1	RESUMO (E PALAVRAS-CHAVE)	30
3.2	ABSTRAC (AND KEYWORDS)	32
3.3	INTRODUÇÃO	36
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.6	CONCLUSÃO.....	55
4	Artigo B - Caracterização morfológica, patogenicidade de espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. isolados de plantas de soja e o monitoramento da sensibilidade do fungo à inibidores da desmetilação, metil benzimidazol carbamato e inibidores da quinona oxidase	56
4.1	RESUMO (E PALAVRAS-CHAVE)	56
4.2	ABSTRAC (AND KEYWORDS)	58

4.3	INTRODUÇÃO	60
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.6	CONCLUSÃO.....	88
5	CONCLUSÕES GERAIS	89
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] está entre as atividades econômicas de destaque na América do Sul, com crescimento da área cultivada nas últimas décadas. Juntamente com o aumento de área, os problemas com doenças se intensificaram devido a fatores como cultivo em áreas extensas (monocultura), ausência de rotação de culturas, utilização de cultivares suscetíveis e introdução de novas doenças. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (TECNOLOGIAS, 2013).

Entre as estratégias de manejo recomendadas para o controle das doenças está a utilização de fungicidas. No Brasil, a utilização de fungicidas na cultura da soja iniciou com o surto epidêmico de oídio [*Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takam], na safra 1996/97. Posteriormente, o aumento da incidência das doenças de final de ciclo [causados por *Septoria glycines* Hemmi e *Cercospora kikuchii* (Tak. Matsumoto & Tomoy.) M.W. Gardner], principalmente em função do cultivo intensivo e da ausência de rotação de culturas, também demandaram o registro de fungicidas. Com a introdução do fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., causador da ferrugem-asiática, no Brasil, em 2001 (YORINORI et al., 2005), e a ausência de cultivares resistentes para o controle dessa doença, novos produtos foram registrados e as aplicações de fungicidas foram intensificadas. No Brasil, a ferrugem-asiática é o principal alvo das aplicações de fungicidas. Entre outras doenças também controladas por fungicidas pode-se citar a mancha-alvo [*Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei.], a antracnose [*Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore], o mofo-branco [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] e a mela (*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn AG1).

O fungo *C. cassiicola* infecta mais de 350 plantas hospedeiras em mais de 50 países tropicais e subtropicais (FARR et al., 2007), podendo afetar as folhas, os caules, os frutos, as sementes e as raízes. Nos últimos anos, a incidência da mancha-alvo tem aumentado na cultura da soja em razão da utilização de cultivares suscetíveis de alto rendimento. O fungo *C. truncatum* é o agente causal da antracnose na soja, sendo essa uma das principais doenças que ocorre na região dos Cerrados brasileiros (TECNOLOGIAS, 2011), causando perdas de 30% a 100%.

As partes da planta que podem ser afetadas são as folhas, os ramos, as inflorescências e as vagens (MANANDHAR; HARTMAN, 1999).

Apesar da grande contribuição que os fungicidas proporcionam no controle de doenças, seu uso intensivo pode ter como consequência a seleção de isolados de fungos menos sensíveis ou resistentes. Populações de fungos menos sensíveis a fungicidas já estão presentes nas populações existentes na natureza, mesmo sem nunca terem sido expostas aos mesmos. Quando os fungicidas, com modo de ação específico, começam a ser aplicados, tendem a eliminar populações mais sensíveis do patógeno, aumentando a frequência das populações menos sensíveis, atuando como agentes de seleção (GISI; SIEROTZIKI, 2009). No Brasil, os problemas de resistência ou menor sensibilidade de fungos na cultura da soja têm sido observados após falha de controle com fungicidas no campo. Os programas de monitoramento de resistência no Brasil são conduzidos por empresas filiadas ao FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). Na cultura da soja, está restrito ao monitoramento da sensibilidade do fungo *P. pachyrhizi* e mais recentemente do fungo *C. cassicola*. Dentre os principais modos de ação utilizados no controle de doenças na cultura da soja no Brasil destacam-se os Metil Benzimidazol Carbamato (MBC), os Inibidores de Desmetilação (IDM), os Inibidores de Quinona Oxidase (IQo) e mais recentemente a nova geração de moléculas Inibidoras da Succinato Desidrogenase (ISDH).

Para determinar um nível de referência ou “baseline” de sensibilidade para comparações subsequentes, devem ser avaliados amostras de campo dos principais agentes patogênicos coletados antes do fungicida ser utilizado comercialmente (BRENT, 2012). Parâmetros como a CE_{50} (concentração efetiva do fungicida para inibir 50% da população em estudo) definem a fungitoxicidade de uma substância química (SHARVELLE 1961; EDGINGTON; KHEW; BARRON, 1971; LOOMIS, 1995; SILVA et al., 2006).

Um dos métodos mais utilizados para medir a sensibilidade de uma população de patógenos a fungicida e determinar a CE_{50} , é o método de inibição do crescimento micelial da colônia do fungo em meio de cultura (ICM) (DEKKER, 1987; GEORGOPOULOS, 1982). No entanto, o método ICM apresenta desvantagens como necessidade de grande quantidade de meio de cultura, espaço e tempo para se obter os resultados, sendo que a principal desvantagem desse método é medir apenas o crescimento linear da colônia do fungo, sem considerar a densidade da

colônia (DEKKER, 1987). Por outro lado, o monitoramento da sensibilidade de fungos a fungicidas pode ser realizado através de ensaios de microtitulação colorimétrica. Essa metodologia vem sendo recomendada pelo FRAC internacional, e utilizada em várias pesquisas de monitoramento de resistência (VEGA et al., 2012; RAMPERSAD, 2011; STAMMLER; BENZINGER; SPEAKMAN, 2007; STAMMLER; SPEAKMAN, 2006). Neste método, o fungo é cultivado em poços de microplacas e seu crescimento é medido por espectrofotômetro (BROEKAERT et al., 1990; LUDWIG; BOLLER, 1990), sendo possível medir a inibição total da biomassa fúngica na presença de fungicida de forma automática e de um grande número de isolados simultaneamente, superando as desvantagens do método de ICM.

O objetivo do estudo foi i) Avaliar a eficiência do método de microtitulação colorimétrica para medir a sensibilidade de *C. cassicola* a fungicidas IDM (protioconazol) e MBC (carbendazim); ii) Realizar a caracterização morfológica e patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* spp.; iii) Avaliar a sensibilidade aos fungicidas carbendazim (MBC), protioconazol (IDM) e piraclostrobina (IQo) para: 133 isolados de *C. cassicola* coletados nos estados do Paraná e de Mato Grosso, durante as safras 2012/13 e 2013/14, e comparar com as respostas de populações depositadas na Micoteca da Embrapa Soja (MES), coletadas antes do uso intensivo de fungicidas e informações disponíveis na literatura; e para 29 isolados de *C. truncatum*, depositados na MES, coletados em várias regiões do Brasil, de 1992 a 2011 e coletados no estado do Paraná, durante a safra 2012/13.

A tese será apresentada na forma de artigo científico, a saber:

- Artigo A: Método de microtitulação colorimétrica para determinar a sensibilidade do fungo *Corynespora cassicola* a fungicidas e o monitoramento da sensibilidade do fungo a inibidores da desmetilação, metil benzimidazol carbamato e inibidores da quinona oxidase;
- Artigo B: Caracterização morfológica, patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* spp. isolados de plantas de soja e o monitoramento da sensibilidade do fungo a inibidores da desmetilação, metil benzimidazol carbamato e inibidores da quinona oxidase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta anual originária da China, sendo uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo (AZEVEDO, 1993; BORÉM, 1999). A expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional.

A soja é largamente cultivada no Brasil graças a sua adaptação, alta produtividade, fácil manejo, condições favoráveis ao cultivo e facilidade de mecanização, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2014/15, de acordo com o oitavo levantamento de safras da Conab, a produção do Brasil chegou a 95,07 milhões de toneladas de soja em uma área de plantio de 31,57 milhões de hectares. Superando em 8,95 milhões de toneladas, os 86,12 milhões da safra 2013/14 (CONAB, 2015).

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil. Esse número continua crescendo com a expansão para novas áreas, a introdução de novos patógenos e como consequência da monocultura intensiva (TECNOLOGIAS, 2013).

2.2 MANCHA-ALVO

O fungo *Corynespora cassiicola* é causador da mancha-alvo na soja. A doença é encontrada praticamente em todas as áreas produtoras de soja, tendo maior importância no cerrado brasileiro (SOARES; GODOY; OLIVEIRA, 2009).

O fungo possui como característica principal a ausência de reprodução sexual, sendo produzidos conídios a partir de células conidiógenas (KRUGNER; BACCHI, 1995). No estágio vegetativo, *C. cassiicola* produz micélio ramificado, pálido a amarronzado, com hifas tipicamente septadas (PERNEZNY; SIMONE, 1993). Os conídios são produzidos nos conidióforos, podem ser únicos ou

em cadeia, de formato variável, clavado a cilíndrico, reto ou curvo, sub-hialino a oliváceo marrom, com quatro a 20 pseudoseptos, de 40 µm a 220 µm de comprimento e 9 µm a 22 µm de espessura (ABUL-HAYJA; WILLIAMS, 2011).

A gama de hospedeiros consiste em mais de 70 espécies de plantas, distribuídas em diversos países de clima tropical e subtropical. Entre os hospedeiros, incluem-se as culturas de pepino, caupi, soja, gergelim, quiabo, algodão, tomate, acerola, mamão papaya, mandioca, berinjela, fumo (SILVA et al., 1995).

Com base nas pesquisas realizadas com esse patógeno no Brasil, constata-se o crescente aumento de relatos deste fungo em diversos hospedeiros. Essa situação é preocupante e o ciclo de vida desse fungo deve ser estudado em condições brasileiras, no intuito de determinar as formas de controle dessa doença (TERAMOTO, 2008).

Na cultura da soja, o primeiro relato do patógeno foi nos Estados Unidos, em 1945 (OLIVE; BAIN; LEFEBVRE, 1945). O primeiro relato desse patógeno em soja no Brasil foi feito por Almeida et al. (1976), que realizaram um levantamento de doenças de soja no norte do Estado do Paraná e sul do Estado de São Paulo. Os autores identificaram o fungo *C. cassiicola* ocorrendo em plantios de soja do município de Tarumã, SP. Na safra 1987/88, a mancha-alvo foi constatada nos Estados de Mato Grosso, do Mato Grosso do Sul e do Rio Grande do Sul (YORINORI, 1989). Em 1995/96, a doença foi observada em diversas propriedades nos municípios de Cascavel, de Castro, de Ponta Grossa e de Pitanga, no Estado do Paraná, causando desfolha em diferentes níveis e redução de rendimento em todas as cultivares (YORINORI, 1996).

O fungo *C. cassiicola* sobrevive em restos culturais, plantas voluntárias, na semente de soja e em hospedeiros alternativos. Pode sobreviver em hastes, em raízes, em sementes, assim como nos restos culturais de soja, na forma de clamidósporos. Além disso, o patógeno pode colonizar restos culturais de um grande número de espécies vegetais (SNOW; BERGGREN, 1989).

Segundo Pernezny e Simone (1993), o patógeno do gênero *Corynespora* tem vários meios de sobrevivência e disseminação no campo, podendo sobreviver acima de dois anos em restos de cultura (KUROSAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). A ampla gama de hospedeiros deste fungo também contribui para a sua sobrevivência no campo, podendo infectar mais de 350 plantas hospedeiras

em mais de 50 países de clima tropical e subtropical (FARR et al., 2007). A disseminação de *C. cassiicola* no campo é, predominantemente, pelo ar e ocorre normalmente no período matutino (PERNEZNY; SIMONE, 1993). O fungo *C. cassiicola* é capaz de penetrar direta e rapidamente através da epiderme em apenas 12 horas após a inoculação artificial do patógeno sobre as folhas do hospedeiro (BRETON; SANIER; D'AUZAC, 2000).

Os primeiros sintomas de mancha-alvo em soja aparecem cinco a sete dias após a penetração, em temperaturas de 20° C a 30° C e umidade relativa do ar acima de 80%. O fungo produz esporos nas duas faces das folhas, mas são mais abundantes na face abaxial (MELLO, 2009).

Os sintomas em folhas surgem como pequenos pontos com um halo amarelo, que crescem até dois centímetros de diâmetro e tornam-se circulares, de coloração parda. O nome da doença se deve á presença de anéis concêntricos, mais escuros no centro e com halos amarelos nas manchas, que lembram o formato de um alvo. O fungo pode atingir também os pecíolos e haste, que se tornam marrom escuro, e, os entrenós, onde causa pequenos pontos alongados, formando lesões. Manchas nas vagens são geralmente circulares e de um milímetro de diâmetro, levemente deprimidas, de cor roxo escuro com margens marrons (ALMEIDA et al., 2005; SNOW; BERGGREN, 1989).

Durante períodos de chuvas ou de umidade prolongada, as manchas coalescem e cobrem totalmente a vagem. Em alguns casos, o fungo penetra na vagem e produz pequenas lesões marrons escuras na semente (SNOW; BERGGREN, 1989).

A temperatura para o desenvolvimento do patógeno varia de 18° C a 21° C (mínima de 7° C, máxima de 39° C) (SNOW; BERGGREN, 1989; ELLIS, 1971, SEAMAN; SHOEMAKER; PETERSON, 1965). Almeida et al. (1994) em trabalho sobre diferenciação de isolados de *C. cassiicola* demonstraram que o fungo se desenvolve vagarosamente em meio de cultura BDA, formando um micélio de coloração cinza-esverdeada.

Para que ocorra a infecção na folha, a umidade relativa do ar deve ser igual ou maior que 80%, sendo que o déficit hídrico inibe o crescimento do fungo (SNOW; BERGGREN, 1989).

2.2.1 Danos

A mancha-alvo ocorre no final do ciclo da soja, causando prejuízos econômicos. Trata-se de uma doença potencialmente destrutiva em cultivares suscetíveis em épocas de elevada precipitação pluviométrica (PHILLIPS, 1989).

A doença causa lesões de anéis concêntricos de coloração escura nas folhas de soja, reduzindo a área foliar sadia, interferindo diretamente no processo de fotossíntese (BEDENDO, 1995) e acarretando na baixa produção de grãos. Desfolha prematura pode ocorrer em cultivares suscetíveis, assim como a decomposição das vagens e lesões em hastes.

Hartwig (1959) relatou que num período de cinco anos de estudo no delta do Mississippi nos EUA, os danos causados pela mancha-alvo variaram de 18% a 32%. Na safra 2004, nos EUA, foram estimados danos de 20% a 40% (KOENNING; CRESWELL, 2006).

No Brasil, na safra 1995/96 foi verificada a ocorrência desta doença de forma generalizada no estado do Paraná, causando desfolha prematura e danos estimados entre 40% a 45% (YORINORI, 1996).

Trabalhos conduzidos pela Universidade de Rio Verde (FESURV), no estado do Tocantins, demonstram que os danos podem variar de 10% a 20% (CARREGAL; CAMPOS; SILVA, 2008).

2.2.2 Controle Químico

Entre as estratégias de manejo recomendadas para essa doença tem-se a utilização do controle químico (ALMEIDA et al., 2005). Embora alguns dos fungicidas comumente utilizados na cultura da soja apresentem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle dessa doença, não tem sido observada eficiência satisfatória no campo.

O controle químico de *C. cassicola* pode ser realizado por meio de tratamento de sementes, que visa a erradicação deste patógeno. Recomenda-se a utilização da associação de carbendazim (150 g i.a. L⁻¹ SC) e tiram (350 g i.a. L⁻¹ SC) na dose de 200 mL do produto comercial para 100 Kg de sementes (REIS; REIS; CARMONA, 2010). Mas, devido aos relatos de menor eficiência do carbendazim no controle de *C. cassicola* nas últimas safras, o uso desse ingrediente

ativo pode ficar comprometido para o tratamento de sementes. No entanto, não foi comprovada a eficiência da transmissão de *C. cassicola* da semente para os órgãos aéreos da soja (AVOZANI, 2011).

Trabalhos realizados por Barcelos et al., (2010) com o objetivo de avaliar a eficiência de fungicidas para o controle químico da mancha-alvo em soja, no município de Campo Verde, MT, mostraram que as maiores produtividades foram obtidas nos tratamentos com piraclostrobina + epoxiconazol, ciproconazol + trifloxistrobina, tebuconazol + trifloxistrobina e propiconazol + trifloxistrobina, sendo que os fungicidas piraclostrobina + epoxiconazol, flutriafol + tiofanato metílico, ciproconazol + trifloxistrobina e propiconazol + trifloxistrobina resultaram nas menores severidades de mancha-alvo.

Em outro estudo, Avalhães et al. (2010) relatam que os melhores resultados no controle da mancha-alvo no município de Campo Verde, MT, foram com a aplicação de tebuconazol + azoxistrobina associados ou não ao carbendazim, nas épocas de pré-floração, início da formação de vagens, início de enchimento de grãos e 50% a 75% de granação. O tratamento que resultou na melhor produtividade ($61,5 \text{ sacas ha}^{-1}$) foi a mistura azoxistrobina + ciproconazole nos mesmos momentos de aplicação.

Em ensaios cooperativos conduzidos no Brasil, para avaliar a eficiência de fungicidas para o controle de mancha-alvo no campo, as menores severidades e as maiores porcentagens de controle foram observadas para os tratamentos com mistura de piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapyroxade, nas doses de $64,8 + 40 + 40 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ e $81 + 50 + 50 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, respectivamente, seguido do fluopyram a $200 \text{ g i.a. ha}^{-1}$. As menores porcentagens de controle foram observadas para os tratamentos com carbendazim, apresentando, no entanto, severidade inferior à testemunha. Os fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis (Metil Benzimidazol Carbamatos – MBC), amplamente utilizados no campo para o controle da mancha-alvo, apresentaram eficiência inferior aos outros produtos (GODOY et al., 2014).

2.3 ANTRACNOSE

A primeira menção de ocorrência da antracnose em soja foi realizada na Coreia, no ano de 1917 e, desde então, foi constatada em todas as

zonas temperadas de produção de soja, causando perdas na produção de soja, onde quer que esta leguminosa seja plantada (TIFFANY, 1951).

A antracnose da soja é uma das principais doenças que ocorre na região dos Cerrados brasileiros (TECNOLOGIAS, 2011). É causada pela fase anamórfica do fungo *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W. D. Moore. O fungo é caracterizado pela formação de acérvulos escuros, de forma oval a alongada, com a presença de numerosas setas, os conídios são hialinos, unicelulares e curvos (alantóides), com conidióforos que estão no interior dos acérvulos (MANANDHAR; HARTMAN, 1999).

Colletotrichum truncatum pertence ao grupo de *Colletotrichum* com conídios curvos (DAMM et al., 2009) que inclui outras importantes espécies, tais como *C. graminicola* e *C. dematium*, que já foram associadas com a antracnose da soja (HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999). Recentemente duas espécies com conídios truncados, *C. chlorophyti* e *C. incanum*, foram descritas como causadoras da antracnose em soja nos EUA (YANG; STWEART; HARTMAN, 2013; YANG; HAUNDENSHIELD, HARTMAN, 2014), mas não foram encontradas em nenhuma outra região produtora. Além disso, segundo Hartman, Sinclair e Rupe (1999), espécies de *Colletotrichum* com conídios cilíndricos também estão associadas à antracnose da soja, tal como *C. gloeosporioides*.

O conjunto de informações disponíveis indica que a etiologia da antracnose da soja não está plenamente esclarecida, especialmente na América do Sul. Até o presente momento, na América do Sul, dentre as espécies com conídios curvos, apenas *C. truncatum* foi associada à soja. Dias (2014) estudando a diversidade de 54 isolados de *Colletotrichum* de soja provenientes do Brasil e da Argentina reportou e caracterizou a patogenicidade de *C. cliviae*, espécie de conídios cilíndricos, em comparação com *C. truncatum* e outras espécies de *Colletotrichum*, proveniente de isolados do Tocantins.

O fungo pode atacar a planta durante quase todo seu ciclo de vida, porém mais frequentemente no estágio de floração ao enchimento de grãos. As partes da planta que podem ser afetadas são as folhas, os ramos, as inflorescências e as vagens (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Quando o fungo é transmitido pela semente, os primeiros sintomas são observados durante a germinação, causando damping-off em pré ou pós-emergência. Nas plântulas que emergem surgem lesões

necróticas deprimidas nos cotilédones, de cor cinza a negra, podendo ocasionar a morte da plântula (BAILEY; JEGER, 1992; CAMPOS; SILVA; SILVA, 2006).

Durante os primeiros estádios reprodutivos da soja, áreas marrons, de forma irregular podem aparecer nos ramos, vagens e pecíolos das plantas infectadas. Ramos, vagens e folhas podem estar infectados e não apresentar sintomas. Com o avanço da doença, os tecidos infectados são recobertos com acérvulos, os quais produzem setas que podem ser vistas a olho nu (MANANDHAR; HARTMAN; SINCLAIR; RUPE 1999). Sintomas foliares incluem necroses de nervuras, enrolamento foliar e cancro nos pecíolos. O fungo compromete o desenvolvimento das vagens já em início de formação, podendo reduzir a qualidade fisiológica das sementes (HAMAWAKI et al., 2002).

Os hospedeiros primários do *C. truncatum* são o amendoim (*Arachis hipogea*) o pimentão (*Capsicum annuum*), a lentilha (*Lenus culinaris*), a alfafa (*Medicago sativa*), o feijão lima (*Phaseolus lunatus*), o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), a ervilha (*Pisum sativum*), a fava (*Vicia sativa*), o feijão mungo (*Vigna radiata*), o caupí (*Vigna unguiculata*) e a soja (*Glycine max*) (CABI, 2005).

A doença se desenvolve principalmente em clima quente e úmido, com chuvas no período de maturação à colheita (HAMAWAKI et al., 2002). A alta intensidade da antracnose nas lavouras também pode ser atribuída ao excesso de população de plantas, cultivo contínuo de soja, estreitamento nas entre-linhas (35 - 43 cm), uso de sementes infectadas, infestação e dano por percevejo e deficiências nutricionais, principalmente de potássio (COSTA, 2005).

Estudos de campo no Cerrado brasileiro, sobre o efeito das condições do ambiente sobre o desenvolvimento da antracnose, apresentaram que a incidência máxima da doença foi obtida entre a segunda quinzena de setembro e a primeira quinzena de outubro, sobre condições de temperatura do ar, umidade relativa do ar e chuva de 28,4° C, 76% e 92,5 mm, respectivamente. A menor incidência da doença foi relatada sob alta temperatura do ar e pouca chuva (SINGH; SINGH; SINGH, 2001).

A interação entre temperatura do ar, umidade relativa do ar e luminosidade, sobre a germinação de conídios de *C. truncatum* e a posterior infecção de vagens de soja, foram estudadas em laboratório. A germinação do conídio bem como a alongação do tubo germinativo foi maximizada a 20° C, e a infecção nas vagens, foi maximizada a 20° C. Três horas de luz, seguido de nove

horas de escuro, mostrou melhor efeito para a germinação dos conídios e alongação do tubo germinativo. A infecção da vagem foi favorecida em regime luminoso de 20 horas de luz seguido de 12 horas de escuro, sendo que a infecção da vagem e o desenvolvimento dos acérvulos foram mais demorados sob luz contínua. Umidade relativa do ar próxima dos 100% foi requerida para a infecção das vagens e desenvolvimento dos acérvulos, entretanto, em testes de germinação em lâminas, quando utilizado 100% de umidade relativa do ar, não houve germinação (KAUSHAL; ANIL; TYAGI, 1998).

Hartman, Manandhar e Sinclair, (1986), encontraram estruturas reprodutivas do gênero *Colletotrichum* e de sua forma teleomórfica *Glomerella* em 22% de 5.000 amostras coletadas em campo.

A disseminação de *C. truncatum*, em grandes distâncias, pode ocorrer através das sementes contaminadas. Níveis altos de infecção de sementes de soja em torno de 81% já foram descritos em regiões tropicais e subtropicais (HEPPERLY et al., 1983). Em curta distância a disseminação se dá por respingos de água da chuva ou de irrigação por aspersão.

2.3.1 Danos

Em condições de alta umidade relativa do ar, a doença causa apodrecimento e queda das vagens, abertura das vagens imaturas e germinação dos grãos em formação. Pode causar perda total de produção e, com maior frequência, causar redução do número de vagens, induzindo a planta à retenção foliar e haste verde (TECNOLOGIAS, 2013). Geralmente, está associada com a ocorrência de diferentes espécies de *Phomopsis*, que causam a seca da vagem e da haste. Além das vagens o fungo *C. truncatum* infecta a haste e outras partes da planta, causando manchas castanho-escuras. É possível que seja uma das principais causadoras da necrose da base do pecíolo (COSTA, 2005).

Colletotrichum truncatum é um dos fungos associados às doenças de final de ciclo da soja e, portanto seu dano é avaliado conjuntamente com outros patógenos (KLINGELFUSS; YORINORI, 2001). A infecção pelo patógeno nos ramos e vagens, em anos com as condições climáticas favoráveis à doença, afeta o rendimento da cultura (EMBRAPA, 2008).

Nos EUA são relatadas perdas em função da redução do “stand”, qualidade de sementes e produtividade da ordem de até 26% ou mais, enquanto que na Tailândia e em algumas regiões do Brasil as perdas são aproximadamente de 30% a 100% (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Em áreas de cerrado da região central do Brasil a antracnose da soja pode ocasionar perda total de produção (NECHET et al., 2004).

2.3.2 Controle Químico

Os fungicidas registrados para o controle de antracnose em soja são utilizados no tratamento de sementes que conferem proteção até o estágio de plântula (PICININI; FERNANDES, 1998).

Costa (2005), estudando o efeito dos fungicidas para o controle de *S. glycines*, *C. kikuchii* e *C. truncatum* observou que a aplicação sequencial de difeconazol e azoxistrobina proporcionou melhor controle dessas doenças, sendo que os melhores resultados foram obtidos com aplicações de azoxistrobina no estágio R4 da soja e difeconazol no estágio R5.1.

Trabalhos têm sido realizados para avaliar a eficiência do tratamento de sementes com fungicidas no controle de *C. truncatum* (GOULART, 2001; GIANASI et al., 2000). Reduções significativas na incidência desse patógeno em sementes de soja foram obtidas com os tratamentos tolilfluanid + tiofanato metílico, thiabendazol + thiram e tiofanato metílico + thiram (GOULART, 2001), thiram + benomil e thiabendazol (GOULART, 1998), thiabendazol + quintozene (GIANASI et al., 2000), e fludioxonil + mefenoxan e thiabendazol + thiram (PEREIRA et al., 2009).

Fontes (2000) observou a superioridade de inibidores de desmetilação (IDMs), como o tebuconazol, em relação ao padrão benzimidazol, e em outro experimento. Rizza (1999), trabalhando em condições semelhantes, encontrou resultados similares quanto a baixa eficácia dos benzimidazóis, quando comparado a outros IDMs (difeconazol e propiconazol + difeconazol), em apenas uma aplicação em R5.1.

2.4 FUNGITOXICIDADE E SENSIBILIDADE DE PATÓGENOS

Fungicidas são substâncias químicas de origem natural ou sintética que quando aplicadas às plantas protegem-nas da penetração e/ou posterior desenvolvimento de fungos patogênicos em seus tecidos (BLUM, 2009). Este conceito tem sido ampliado com o surgimento de novas substâncias químicas, que controlam doenças causadas por fungos, que não atuam diretamente sobre o agente causal da doença, mas que atuam como ativadores de mecanismos de defesa das plantas (GHINI e KIMATI, 2000; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005; REIS; FORCELINI; REIS, 2007).

A fungitoxicidade é uma propriedade inerente a uma substância química e se caracteriza pela toxicidade aos fungos em baixas concentrações (REIS; FORCELINI; REIS, 2007). Toxicidade é a capacidade que uma substância química apresenta de produzir um efeito nocivo sobre um sistema biológico, alterando funções ou levando o organismo à morte, sob determinada condição de exposição (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Por outro lado, um fungo, em função de suas características genéticas apresenta, ou não, sensibilidade a uma dada molécula. Se um fungo for sensível a um fungicida, este apresenta fungitoxicidade. Se o fungicida não apresenta fungitoxicidade, o fungo é, então, considerado insensível (REIS; FORCELINI; REIS, 2007).

Parâmetro como a CE_{50} (concentração efetiva para matar 50% dos microrganismos submetidos ao teste) define a fungitoxicidade de uma substância química (SHARVELLE 1961; TORGESON, 1967; EDGINGTON et. al., 1971; LOOMIS, 1995; RUSSEL, 2004; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Edgington, Khew e Barron (1971) propõem os seguintes critérios para enquadrar uma substância fungicida, com relação à fungitoxicidade: substância que apresenta $CE_{50} < 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ = alta fungitoxicidade e sensibilidade; CE_{50} entre $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ = moderada fungitoxicidade, CE_{50} entre $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ = baixa fungitoxicidade e insensibilidade; e $CE_{50} > 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ = não fungitóxico e insensibilidade ao fungicida.

A CE_{50} é específica e constante para uma determinada substância química e para um determinado patógeno. Um valor baixo da CE_{50} representa uma alta ação fungitóxica (REIS; FORCELINI; REIS, 2007). Loomis (1995), quando descreve sobre a toxicidade de uma droga, emprega o termo “potente” para uma

substância química, se a dose requerida para produzir qualquer efeito estiver numa faixa muito baixa.

A descrição da potência e da eficácia de um fungicida pode ser demonstrada pela curva de dose-resposta, onde são definidos os valores das doses/concentrações efetivas (TORGESON, 1967). A posição da curva de dose-resposta, no eixo da dose, representa o índice da potência da droga, indicando a quantidade da droga para produzir determinado efeito. O limite superior da curva da dose-resposta indica a eficácia do fungicida (droga) e refere-se à resposta máxima que pode ser provocada por ele. Normalmente, a eficácia de uma droga é o fator mais decisivo para sua escolha (SILVA, 2006).

A resistência a fungicidas é definida como uma alteração herdável e estável em um fungo em resposta à aplicação de um fungicida, resultando numa redução da sensibilidade ao produto. Reis, Forcelini e Reis (2007) ainda sugerem que o termo insensibilidade não deva ser utilizado como sinônimo de resistência, uma vez que o termo sugere a completa falta de sensibilidade, o que não se observa na prática. Logo, deveria ser utilizado o termo insensibilidade para descrever fungos para os quais um fungicida nunca apresentou efeito. Nem todos os fungos são sensíveis a todos os fungicidas (espectro de ação); alguns sempre serão insensíveis a certas moléculas.

Se a CE_{50} de um fungicida, ao longo do tempo, apresentar alteração para valores superiores aos inicialmente estabelecidos, visando o controle de um determinado patógeno, poderá indicar redução na sensibilidade àquele fungicida (REIS; FORCELINI; REIS, 2007).

2.5 RESISTÊNCIA DE FUNGOS A FUNGICIDAS

Os fungicidas são importantes ferramentas para o controle das principais doenças das plantas em sistemas intensivos de produção de culturas (HOLLOMON, 2012). Apesar da grande contribuição que os fungicidas proporcionam no controle de doenças, seu uso intensivo pode ter como consequência a seleção de isolados de fungos menos sensíveis ou resistentes. Populações de fungos menos sensíveis a fungicidas já estão presentes no conjunto de populações existentes na natureza, mesmo sem nunca terem sido expostas ao mesmo. Quando os fungicidas, com modo de ação específico, começam a ser

aplicados, tendem a eliminar populações mais sensíveis do patógeno, aumentando a frequência das populações menos sensíveis, atuando como agentes de seleção (BRENT, 2011).

A resistência de fungos a fungicida pode ser qualitativa ou quantitativa. Na primeira, ocorre a perda de efetividade do fungicida de modo repentino e marcante pela presença bem definida de populações de patógenos que apresentam suscetibilidade e resistência com respostas que variam amplamente, como, por exemplo, o que acontece para o modo de ação dos metil benzimidazol carbamatos (MBC) e inibidores de quinona oxidase (IQo). Na resistência quantitativa ocorre o declínio no controle da doença assim como a diminuição da suscetibilidade das populações do patógeno, demonstradas por testes de monitoramento. A resistência quantitativa se manifesta gradualmente, são parciais e ocorrem em graus variáveis, como por exemplo para o modo de ação dos fungicidas inibidores de desmetilação (IDM) (FRAC, 2007).

Embora a resistência resulte da seleção de mutações em populações de patógenos, é possível gerenciar a resistência de forma efetiva, contando com conhecimento suficiente sobre os mecanismos de resistência, bons procedimentos de monitoramento e acesso a produtos com diferentes modos de ação. Na verdade, até hoje nenhum grupo de fungicida foi perdido unicamente devido à resistência das populações de patógenos (HOLLOMON, 2012).

Fungicidas MBC representam o marco inicial dos problemas de resistência (DELP, 1979). Esse composto, que inibe a polimerização da tubulina durante a mitose, apresentou casos de resistência após apenas um ano de uso (SCHROEDER; PROVVIDENTI, 1969; GEORGOPOULOS; DAVOS, 1973). Desde o início da sua comercialização, pelo menos 100 espécies de fungos desenvolveram algum grau de resistência a esse grupo (FRAC, 2013). As mutações de ponto em 10 locais diferentes no gene β -tubulina confere resistência aos fungicidas benzimidazóis, mas apenas dois deles são comumente encontrados na prática, e somente envolvem algumas das possíveis alterações de aminoácidos (HOLLOMON et al., 1997). Alguns fungicidas MBC foram voluntariamente retirados do mercado pela falta de eficiência (WYENANDT; MAXWELL, 2011). Na cultura da soja, os principais ingredientes ativos registrados com esse modo de ação são o carbendazim e o tiofanato-metílico para doenças de final de ciclo, antracnose e mancha-alvo. No entanto, sua eficiência no campo tem sido baixa (GODOY et al.,

2013). Resistência do fungo *C. cassiicola*, isolado de folhas de soja, a MBCs tem sido relatada nos últimos anos no Brasil em diferentes regiões produtoras (AVOZANI, 2011; TERAMOTO et al., 2012; XAVIER et al., 2013). Apesar da baixa eficiência, os MBCs representaram 6% das recomendações para o controle das doenças na soja, correspondendo a 10,6 mil toneladas do volume de fungicidas comercializados em 2012 no Brasil (KLEFFMANN, 2012).

Os fungicidas IQo interferem na respiração mitocondrial (BRENT, 1998). As primeiras estrobilurinas foram lançadas no mercado em 1996 e rapidamente tornaram-se um dos mais importantes grupos de fungicidas agrícolas. Logo após a introdução comercial dos IQo, em 1996, foram detectados isolados resistentes de *Podospora fusca*, agente causal do míldio pulverulento das cucurbitáceas, em muitas partes do mundo (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Na maioria dos casos de resistência descritos ocorreu uma mudança pontual no citocromo b, trocando o aminoácido guanina na posição 143 por alanina (G143A). Uma vez que a resistência aos IQo ocorre dentro de uma população fitopatogênica, a pressão de seleção imposta conduzirá a resistência da população inteira, e conseqüentemente, a qualquer outra molécula IQo (MCGRATH, 2001). Resistência baseada na mutação G143A já foi relatada para *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora beticola*, *Cercospora sojina*, *Microdochium* spp. e *Pyricularia oryzae* (FRAC, 2013). Altos níveis de resistência a fungicidas IQo tem sido relatados em diversos fungos a campo (FRAC, 2013). Além do G143A, a troca de uma fenilalanina por leucina na posição 129 (F129L) e de uma glicina por arginina na posição 137 (G137R) tem sido relatada em patógenos com resistência a IQo. A mutação F129L já foi relatada para *Alternaria solani*, *Pyrenophora teres*, *Rhizoctonia solani* (FRAC, 2013) e em 2014 para *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil. Isolados com F129L ou G137R apresentam resistência moderada (parcial) ou mudança de sensibilidade (HOLLOMON, 2012).

Os fungicidas IDM representam um importante modo de ação para o controle de doenças. Por algum tempo, pensou-se que estes compostos não fossem capazes de desenvolver resistência porque a evidência experimental sugeria que os mutantes resistentes eram menos aptos a sobreviver do que isolados sensíveis. No entanto, o uso intensivo em várias culturas levou à seleção de isolados de patógenos menos sensíveis. A genética da resistência a IDMs é poligênica para vários patógenos de plantas e níveis elevados de resistência são observados

somente após uma adaptação gradual (GISI et al., 2000). O desenvolvimento de resistência aos IDMs não leva a uma completa perda de controle da doença e é frequentemente descrito como uma seleção contínua ou mudanças de sensibilidade. Os mecanismos de resistência para IDMs são variáveis e complexos, envolvendo uma ou mais mutações de ponto, superexpressão do gene CYP51 e aumento de regulação de transportadores de efluxo (BRENT, 2011). No Brasil, o uso intensivo de fungicidas na cultura da soja trouxe como consequências a seleção de populações de *P. pachyrhizi* menos sensíveis aos IDM a partir de 2007 (GODOY, 2011; SCHMITZ et al., 2013). Alguns fitopatógenos apresentam variação na sensibilidade a IDMs, tais como *Blumeria graminis* (DC.) Speer, *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt., *Uncinula necator* (Schwein.) Burrill e *Aspergillus fumigatus* (HOLLOMON, 2012).

Apesar da intensificação no uso de fungicidas no Brasil, dados referentes ao monitoramento de resistência só foram publicados para *P. pachyrhizi* e fungicidas IDM (CALEGARO et al., 2009; KOGA et al., 2011; GODOY, 2011) e IQos (SCHMITZ et al., 2013), e restrita ao estado do Paraná, Goiás e Mato Grosso, para *C. cassiicola* a fungicidas MBCs e IDMs (AVOZANI, 2011, TERAMOTO et al., 2012, XAVIER et al., 2013). Falhas de controle de doenças de final de ciclo, antracnose e mancha-alvo com fungicidas dos grupos dos MBC e IQos têm sido frequentemente observadas no campo (CARLIN; KONAGESKI, 2011).

3. ARTIGO A: MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DE *Corynespora cassiicola* A FUNGICIDAS E O MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DO FUNGO A INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO, METIL BENZIMIDAZOL CARBAMATO E INIBIDORES DA QUINONA OXIDASE

3.1 RESUMO

A mancha-alvo da soja é causada pelo fungo *Corynespora cassiicol*. Sua frequência no campo tem aumentado nas últimas safras em função da semeadura de cultivares suscetíveis e da baixa eficiência dos produtos utilizados no controle da doença. Para medir a sensibilidade de patógenos a diferentes grupos de fungicidas, o Comitê de Ação à Resistência de Fungicida (FRAC) tem recomendado o método de microtitulação colorimétrica, em função de ser preciso, rápido, que demanda pouco material de consumo e com capacidade de processar um grande número de amostras em curto espaço de tempo. O objetivo do estudo foi avaliar a eficiência do método de microtitulação colorimétrica para medir a sensibilidade de *C. cassicola* a fungicidas inibidores da desmetilação (IDM), metil benzimidazol carbamato (MBC); e avaliar a sensibilidade de populações do fungo *C. cassicola*, coletadas no estado do Paraná (PR) e do Mato Grosso (MT), nas safras 2012/13 e 2013/14, para os fungicidas MBC, inibidores da quinona oxidase (IQo) e IDM e comparar com as respostas de populações depositadas na coleção da Embrapa Soja, coletadas antes do uso intensivo de fungicidas, e com valores disponíveis na literatura. Esporos dos isolados foram suspensos em meio YBA e adicionados a soluções dos fungicidas carbendazim, piraclostrobina e protioconazol, nas concentrações de 0; 0,0032; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A absorbância foi medida em leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm e valores de CE_{50} estimados. Os valores de CE_{50} obtidos pelo método de microtitulação colorimétrica apresentaram correlação de 0,90 e 0,88 para carbendazim e protioconazol, respectivamente, com os valores obtidos pelo método de crescimento micelial. Dos isolados testados 67% do PR e 87% do MT (carbendazim), 72% do PR e 51% do MT (piraclostrobina) e 11% do PR e 9% do MT (protioconazol) não tiveram a CE_{50} estimada, pois 50% de inibição ocorreu $>50 \mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando a existência de isolados resistentes no campo. As CE_{50} para carbendazim variaram de

0,0045 a 14,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,69 a 2,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente para os isolados de *C. cassiicola* do PR e MT; para piraclostrobina variaram de de 4,17 a 44,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,29 a 20,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente para os isolados do PR e MT; para o protioconazol variaram de 0,0033 a 45,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média 4,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 0,0044 a 17,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média 1,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente para os isolados do PR e MT. O método de microtitulação mostrou-se adequado para discriminar a sensibilidade do fungo *C. cassiicola* aos fungicidas IDM, MBC e IQo testados.

PALAVRAS-CHAVE: benzimidazol, estrobilurinas, mancha-alvo, sensibilidade a fungicidas e triazol,

COLORIMETRIC MICROTITULATION TO EVALUATE THE SENSITIVITY OF *Corynespora cassiicola* OF FUNGICIDES AND MONITORING OF FUNGUS SENSITIVITY TO DESMETHYLATION INHIBITORS, METHYL BENZIMIDAZOLE CARBAMATE AND QUINONE OXIDASE INHIBITORS

3.2 ABSTRACT

The target spot on soybean is caused by the fungus *Corynespora cassiicola*. Its frequency in the field has increased in the recent growing seasons due to the sowing of susceptible cultivars and low efficiency of products used in rust control. To measure the sensitivity of pathogens to different groups of fungicides, the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) has recommended the microtiter method, due to be an precise, reliable, simple, requires fewer material consumption, and it is possible to process a large number of samples in a short time. The objective of the study was to evaluate the efficiency of the colorimetric microtiter method to measure the sensitivity of *C. cassicola* to demethylation inhibition (MDI), methyl benzimidazole carbamate (MBC) fungicides; and to evaluate the sensitivity of *C. cassicola*, collected in the state of Paraná (PR) and Mato Grosso (MT), in the 2012/13 and 2013/14 crops, for MBC, quinone oxidase inhibitors (IQo) and IDM fungicides and compare it with the responses of populations deposited in the collection of Embrapa Soja, collected before intensive use of fungicides, and with values available in the literature. Spore isolates were suspended in YBA and added to solutions of the fungicides carbendazim, pyraclostrobin and prothioconazole, at concentrations of 0; 0.0032; 0.016; 0.08; 0.4; 2; 10 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The absorbance was measured in a microplate reader at a wavelength of 540 nm and EC₅₀ values estimated. The EC₅₀ obtained by colorimetric microtiter method presented a correlation of 0.90 and 0.88 ($p < 0.05$), for carbendazim and prothioconazole, respectively, with values obtained by mycelial inhibition growth assay. The 50% of inhibition was higher than 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for 67% of PR and 87% of the MT isolates (carbendazim), 72% of PR and 51% of the MT isolates (pyraclostrobin), and 11% of PR and 9% of the MT isolates (prothioconazole), proving the existence of resistant isolates in the field. The EC₅₀s for carbendazim ranged from 0.0045 to 14.27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.69 to 2.66 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively to the *C. cassicola* isolates collected in PR and MT; for pyraclostrobin ranged from 4.17 to 44.91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.29 to 20.43 $\mu\text{g mL}^{-1}$

respectively for the isolated from the PR and MT; for prothioconazole ranged from 0.0033 to 45.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean 4.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and 0.0044 to 17.70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean 1.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for isolates of PR and MT, respectively. The microtiter method was suitable to discriminate the sensitivity of *C. cassiicola* to fungicides.

KEYWORDS: benzimidazole, strobilurins, target spot, sensitivity to fungicides, triazole.

3.3 INTRODUÇÃO

A mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, foi relatada pela primeira vez na cultura da soja no Brasil, nos Estados do Paraná e de São Paulo, em 1976 (ALMEIDA et al., 1976). Em 1989, a doença foi relatada nos Estados do Mato Grosso, do Mato Grosso do Sul e do Rio Grande do Sul (YORINORI, 1989). A incidência dessa doença tem aumentado nas últimas safras em razão do aumento da semeadura de cultivares suscetíveis e da baixa eficiência dos fungicidas mais comumente utilizados na cultura da soja, sendo encontrada em praticamente todas as regiões de cultivo do Brasil (GODOY et al., 2014). Nas folhas, os sintomas da doença se iniciam por pontuações pardas, com halo amarelado, evoluindo para grandes manchas circulares, de coloração castanho-clara a castanho-escuro. Cultivares suscetíveis podem sofrer severa desfolha, com manchas na haste e nas vagens. As estratégias de manejo recomendadas para essa doença são a utilização de cultivares resistentes, o tratamento de sementes, a rotação/sucessão de culturas com milho e outras espécies de gramíneas e o controle químico com fungicidas (ALMEIDA et al., 2005).

Apesar da grande contribuição que os fungicidas proporcionam no controle de doenças, seu uso intensivo pode ter como consequência a seleção de isolados de fungos menos sensíveis ou resistentes (BRENT, 2011). No Brasil, os problemas de resistência ou menor sensibilidade de fungos na cultura da soja têm sido observados após falha de controle com fungicidas no campo. Dentre os principais modos de ação utilizados no controle de doenças na cultura da soja, no Brasil, destacam-se os metil benzimidazol carbamato (MBC – *Methyl Benzimidazole Carbamates*), os inibidores de desmetilação (IDM – *DeMethylation Inhibitors*), os inibidores de quinona oxidase (IQo - *Quinone outside Inhibitors*) e, mais recentemente, a nova geração de moléculas inibidoras da succinato desidrogenase (SDHI - *Succinate dehydrogenase inhibitors*) (GODOY et al., 2014).

Resultados de 2011 a 2014 mostram menor eficiência do fungicida carbendazim no controle da mancha-alvo entre os fungicidas avaliados (GODOY et al., 2012; GODOY et al., 2013; GODOY et al., 2014). Resistência de isolados de *C. cassiicola*, obtidos de folhas de soja, a fungicidas MBC tem sido relatada nos últimos anos no Brasil em diferentes regiões produtoras do Paraná, do Mato Grosso e de Goiás (AVOZANI, 2011; TERAMOTO et al., 2012; XAVIER et al., 2013).

Para o monitoramento de resistência de fungos a fungicidas é necessário avaliar um grande número de isolados, além disso os métodos tradicionais de monitoramento requerem muito tempo, espaço e materiais de consumo (RAPOSO et al., 2015). Um dos métodos mais utilizados para medir a sensibilidade de uma população de patógenos a fungicida e determinar a concentração efetiva para reduzir metade do crescimento da colônia do fungo (CE_{50}), é o método de inibição do crescimento micelial da colônia do fungo em meio de cultura (ICM) (DEKKER, 1987; GEORGOPOULOS, 1982). No entanto, o método ICM apresenta desvantagens como necessidade de grande volume de meio de cultura, espaço e tempo para se obter os resultados, sendo que a principal desvantagem desse método é medir apenas o crescimento linear da colônia do fungo, sem considerar a densidade da colônia (DEKKER, 1987). Uma técnica mais precisa seria medir a inibição do fungo através do peso seco da colônia em recipientes contendo diferentes concentrações de fungicida em meio líquido (GEORGOPOULOS, 1982), mas este método requer ainda mais tempo.

Por outro lado, o monitoramento da sensibilidade de fungos a fungicidas pode ser realizado através de ensaios de microtitulação colorimétrica. Essa metodologia vem sendo recomendada pelo FRAC internacional, e utilizada em várias pesquisas de monitoramento de resistência (VEGA et al., 2012; RAMPERSAD, 2011; STAMMLER; BENZINGER; SPEAKMAN, 2007; STAMMLER; SPEAKMAN, 2006). O teste de microtitulação colorimétrica permite medir o aumento da biomassa fúngica. Neste método, o fungo é cultivado em poços de microplacas e seu crescimento é medido por espectrofotômetro (BROEKAERT et al., 1990; LUDWIG; BOLLER, 1990). Esse método possibilita medir a inibição total da biomassa fúngica na presença de fungicida de forma automática e para um grande número de isolados simultaneamente, superando as desvantagens do método de ICM. O ensaio de microtitulação colorimétrica é rápido, reprodutível e fácil. Essas características tornam esse método muito apropriado para a medição rápida e precisa de resistência em uma população de fungos a fungicidas (RAPOSO et al., 2015).

Raposo et al. (2015) estudando a aplicação do método de microtitulação colorimétrica para determinar a resistência de *Botrytis cinerea* a fungicidas, observou que alguns parâmetros deste método apresentaram influência na relação entre a biomassa fúngica e absorção, incluindo o volume total da cultura

no poço, que deve estar entre 75 e 200 μL e a concentração inicial de esporos no poço, que deve estar entre 10-100 esporos por microlitro. Os autores concluíram que, os valores obtidos para CE_{50} pelo método ICM e pelo método de microtitulação colorimétrica apresentaram correlação positiva.

O objetivo do estudo foi avaliar a eficiência do método de microtitulação colorimétrica para medir a sensibilidade de *C. cassicola* a fungicidas IDM e MBC; e avaliar a sensibilidade de populações do fungo *C. cassicola*, coletadas no estado do Paraná (PR) e do Mato Grosso (MT), nas safras 2012/13 e 2013/14, para os fungicidas MBC, IQo e IDM e comparar com as respostas de populações depositadas na coleção da Embrapa Soja, coletadas antes do uso intensivo de fungicidas, e com valores disponíveis na literatura.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a eficiência do método de microtitulação colorimétrica para medir a sensibilidade de *C. cassicola* a fungicidas IDM e MBC, foram utilizados 16 isolados monospóricos de *C. cassicola* da micoteca da Embrapa Soja (MES), coletados de folhas, caule e vagens de soja infectadas de diferentes regiões do Brasil de 1997-2011 (Tabela 3.1). Os isolados foram mantidos em meio de cultura batata dextrose e ágar (BDA) (20 g de dextrose, 15 g de ágar e infusão de 200 g de batata em 1 L de água destilada) a 5°C até a utilização.

Para o monitoramento da sensibilidade de *C. cassicola* aos MBC, IDM e IQo foram utilizados isolados obtidos de folhas de soja infectadas, provenientes de lavouras do estado do Paraná (100) e do Mato Grosso (33), nas safras 2012/13 e 2013/14. Os isolados foram mantidos em placas de Petri com meio BDA a 5°C até a utilização (Tabela 3.2).

Os isolamentos foram realizados a partir de lesões foliares típicas da mancha-alvo. Porções infectadas da folha do hospedeiro foram seccionadas em pequenos fragmentos. Posteriormente foi realizada a desinfestação superficial dos fragmentos em solução de álcool 70% por 60 segundos, hipoclorito de sódio a 0,1% de Cl_2 por 60 segundos e água destilada por 60 segundos. Com o auxílio de uma pinça flambada os fragmentos foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo BDA.

Esporos de *C. cassiicola* foram obtidos através da transferência de disco de micélio de 5 mm diâmetro retirados a partir da borda de uma colônia com aproximadamente 10 dias e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, para possibilitar o crescimento da colônia e, posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente sob luz contínua por três dias para estimular a esporulação. Os esporos foram coletados adicionando-se 8 mL do meio de cultura Yeast Bacto Acetato (YBA) (10 g extrato de levedura, 10 g bacto peptona, 20 g de acetato de sódio (pm: 82,03) em 500 mL de água destilada e autoclavada) e esfregando-os com uma lâmina estéril. A suspensão de esporos obtida foi filtrada em gaze esterilizada e a concentração foi ajustada para 10^5 esporos mL^{-1} com auxílio de um hemacitômetro. Foi adicionada estreptomicina ($0,03 \text{ g L}^{-1}$) ao meio YBA para reduzir a contaminação bacteriana.

Formulações comerciais dos fungicidas carbendazim [50% de ingrediente ativo (ia), Carbendazim Nortox®; Nortox SA], protioconazol (48% ia, Proline®; Bayer CropScience) e piraclostrobina (25% ia, Comet®; Basf) foram utilizadas nos testes.

Para o teste de sensibilidade de *C. cassiicola*, os fungicidas selecionados foram testados nas doses de 0; 0,0032; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os fungicidas foram previamente preparados em solução estoque com água na concentração de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de diluições seriadas até obter as concentrações finais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de cada concentração de fungicida.

Para determinar a sensibilidade de cada isolado ao fungicida pelo teste de microtitulação colorimétrica, foram adicionados 50 μL da suspensão de esporos na concentração de 10^5 esporos mL^{-1} em cada poço da microplaca (microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços, marca Kasvi), seguido da adição de 50 μL das diferentes concentrações do fungicida, num volume final de 100 μL . As concentrações foram distribuídas em linhas (oito concentrações) e os isolados em colunas, sendo realizadas quatro repetições por isolado (quatro colunas). Cada microplaca foi composta de uma testemunha (branco), onde as concentrações eram adicionadas de 50 μL do meio de cultura YBA, seguido da adição de 50 μL das diferentes concentrações do produto fungicida, num volume final de 100 μL ; e dois isolados por placa. As microplacas foram tampadas e envoltas por filme plástico e

colocadas em mesa agitadora por uma hora, para possibilitar a mistura dos produtos com a suspensão de esporos. As microplacas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 25°C, fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Os experimentos foram repetidos.

A absorvância foi medida em um leitor de microplacas (ASYS, Eugendorf, Áustria) no comprimento de onda de 540 nm. O valor da absorvância final foi calculado pela subtração da absorvância da amostra branco (YBA + fungicida) da absorvância dos isolados.

Para calcular os valores de CE_{50} para cada isolado foi utilizado o modelo de regressão linear probit entre porcentagem de controle relativo a absorvância da leitura no branco e logaritmo na base 10 das concentrações (doses) dos produtos. Foi verificada a existência de interação entre os experimentos e, na ausência, os dados foram analisados conjuntamente. Os parâmetros do modelo probit e as estimativas das CE_{50} foram obtidos utilizando a proc probit do sistema SAS[®] Versão 9.1.3. (SAS/SAST, 2003). O coeficiente chi-quadrado de Pearson foi usado para verificar a qualidade do ajuste ($p > 0,01$). Os valores de CE_{50} foram relacionados aos valores obtidos pelo método de inibição de crescimento micelial por Xavier et al. (2013). Para a correlação, quando não foi possível estimar a CE_{50} em razão dos valores terem ocorridos abaixo e acima das maiores doses avaliadas, $0,0032 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, os valores foram fixados nos limites.

Tabela 3.1 - Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola* presentes na Micoteca da Embrapa Soja (MES), ano e local de isolamento, e concentração efetiva de carbendazim e protioconazol para reduzir de 50% do crescimento (CE_{50} - $\mu\text{g mL}^{-1}$) pelo método de microtitulação colorimétrica. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Local	Carbendazim		Protioconazol
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
MES 310	1997	Sarandi, Paraná, BR	0,01601	S	0,01185
MES 311	1997	Campo Mourão, Paraná, BR	0,00455	S	<0,0032
MES 312	1997	Itiquira, Mato Grosso, BR	0,02908	S	<0,0032
MES 313	1998	Nova Mutum, Mato Grosso, BR	0,02039	S	0,0204
MES 317	1999	Palotina, Paraná, Brasil	0,00531	S	0,00617
MES 318	1999	Campo Novos dos Parecis, Mato Grosso, BR	0,00724	S	<0,0032
MES 322	2001	Nova Ventura de São Roque, PR, BR	0,29581	S	<0,0032
MES 629	2007	Campo Verde, Mato Grosso, BR	0,02225	S	0,1348
MES 646	2008	Campos Novos dos Parecis, MT, BR	>50	AR	0,21698
MES 649	2008	Campo Mourão, Paraná, BR	6,505	MR	0,36862
MES 692	2008	Corpus Christi, Canindeyú, PY	0,14443	S	0,2772
MES 926	2011	Londrina, Paraná, BR	0,0195	S	<0,0032
MES 930	2011	Rolândia, Paraná, BR	>50	AR	19,4000
MES 931	2011	Mauá da Serra, Paraná, BR	>50	AR	14,3731
MES 932	2011	Londrina, Paraná, BR	>50	AR	6,28
MES 933	2011	Deciolândia, Mato Grosso, BR	>50	AR	2,25

AR – Altamente resistente, $CE_{50} \geq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; MR - moderadamente resistente, $CE_{50} > 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; S - Sensível, $CE_{50} \leq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Fonte: o próprio autor

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de microtitulação colorimétrica foi utilizado com sucesso para determinar a sensibilidade dos 16 isolados de *C. cassiicola*, coletados em diferentes anos e locais do Brasil, para o fungicida carbendazim e protioconazol. Para o fungicida piraclostrobina, não foi realizada a avaliação de eficiência do teste de microtitulação colorimétrica para determinar a sensibilidade de *C. cassiicola*, pois este não foi testado por Xavier et al., (2013), não havendo dessa forma como comparar os resultados obtidos pela microtitulação colorimétrica com os obtidos pelo método de ICM.

Para carbendazim, a CE_{50} estimada variou de $0,0045 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $6,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método de microtitulação colorimétrica (Tabela 3.1). Os isolados MES 646, 930, 931, 932, 933 não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu acima da maior dose avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). A correlação (r) entre os valores de CE_{50} estimados por Xavier et al. (2013) pelo método de ICM e os valores estimados pelo método de microtitulação foi de 0,9.

As médias dos valores de CE_{50} para carbendazim, para os isolados coletados em 1997 (MES 310, 311 e 312), antes das recomendações de aplicação de fungicida no campo, foi de $0,0165 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para protioconazol nenhum dos isolados avaliados apresentou crescimento em dose acima de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. A CE_{50} estimada variou de $0,00617 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $19,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método de microtitulação colorimétrica. Para os isolados MES 311, 312, 318, 322 e 926 não foi possível estimar a CE_{50} uma vez a porcentagem de inibição na primeira dose avaliada ($0,0032 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi acima de 50%. A correlação (r) entre os valores de CE_{50} estimados pelo método ICM (XAVIER et al., 2013), e pelo método de microtitulação foi de 0,88.

Os valores de CE_{50} pelo método de microtitulação foram menores que os valores observados pelo método de ICM em Xavier et al. (2013), sendo em média 36 vezes menor para carbendazim e 288 vezes menores para protioconazol.

Com base nas diferenças de sensibilidade observadas para os fungicidas carbendazim e piraclostrobina, no teste de monitoramento da sensibilidade de populações do fungo *C. cassiicola*, os isolados testados foram divididos em três fenótipos da seguinte forma: altamente resistente (AR), $CE_{50} \geq 10$

$\mu\text{g mL}^{-1}$; moderadamente resistente (MR), $1 \mu\text{g mL}^{-1} < \text{CE}_{50} < 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; e sensível, $\text{CE}_{50} \leq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Níveis de resistência (moderado e alto) foram observados para os 100 isolados de *C. cassiicola* do estado do Paraná e para os 33 isolados de *C. cassiicola* do estado do Mato Grosso, com base em sua sensibilidade ao carbendazim. A CE_{50} estimada variou de $0,0045 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $14,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados do estado do Paraná, e de $0,69 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $2,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ Mato Grosso (Tabela 3.2). Oitenta e um por cento dos isolados do estado do Paraná não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu abaixo da menor dose avaliada ($0,0032 \mu\text{g mL}^{-1}$) (para 14% dos isolados) ou acima da maior dose avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (para 67% dos isolados). Para o estado do Mato Grosso, 93% dos isolados não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu abaixo da menor dose avaliada ($0,0032 \mu\text{g mL}^{-1}$) (para 6% dos isolados) ou acima da maior dose avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (para 87% dos isolados).

A curva de distribuição dos valores de CE_{50} para carbendazim, encontrada por Xavier et al. (2013), foi usada para monitorar mudanças no pico da distribuição dos presentes isolados. As médias dos valores de CE_{50} para carbendazim, para isolados coletados em 1997, antes das recomendações de aplicação de fungicida no campo, foi de $0,0165 \mu\text{g mL}^{-1}$ (XAVIER et al., 2013). Dos isolados avaliados no estado do Paraná, 68% foram considerados altamente resistentes, 3% foram considerados moderadamente resistentes e 29% foram considerados sensíveis a carbendazim. Dos isolados avaliados do estado do Mato Grosso, 88% foram considerados altamente resistentes, 3% foram considerados moderadamente resistentes e 9% foram considerados sensíveis a carbendazim. De forma geral, os isolados coletados no mesmo município apresentaram níveis de resistência e sensibilidade semelhantes entre si (Tabela 3.2)

Para o fungicida piraclostrobina, foram encontrados níveis de resistência moderado e alto entre os isolados de *C. cassiicola*. Dos isolados avaliados no estado do Paraná, 99% foram considerados altamente resistentes, 1% foi considerado moderadamente resistentes e nenhum dos isolados testados apresentou sensibilidade a piraclostrobina. Para os isolados coletados no estado do Mato Grosso, 82% foram considerados altamente resistentes, 6% foram considerados moderadamente resistente e 12% foram considerados sensíveis a piraclostrobina. A CE_{50} calculada para o piraclostrobina variou de $4,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ a

44,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para isolados coletados no estados do Paraná e de 0,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 20,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados coletados no estado do Mato Grosso. Setenta e dois por cento dos isolados do estado do Paraná não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu acima da maior dose avaliada (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para o estado do Mato Grosso, 51% dos isolados não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu acima da maior dose avaliada (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). De forma geral, os isolados coletados no mesmo município apresentaram níveis de resistência e sensibilidade semelhantes (Tabela 3.2).

Para o fungicida protioconazol não foi assumido uma linha de corte uma vez que a resistência aos IDMs é quantitativa. A resistência a fungicidas IDM ocorre de forma gradual, sendo descrita como mudanças de sensibilidade (BRENT, 2011). Protioconazol foi utilizado na cultura da soja pela primeira vez em 2010, e os maiores valores de CE_{50} observados para populações de 2011 podem indicar uma tendência de mudança de sensibilidade do fungo, com relação às populações de anos anteriores. Embora a resistência cruzada possa ocorrer dentro do grupo e outros IDMs tenham sido intensamente utilizados na cultura da soja desde 2001, protioconazol possui fator de resistência menor que outros IDMs e é o único IDM em grupo isolado (triazolinthiona) (BRENT; HOLLON, 2007).

A curva de distribuição dos valores de CE_{50} para protioconazol, encontrada por Xavier et al. (2013) foi usada para monitorar mudanças no pico da distribuição dos presentes isolados. As médias dos valores de CE_{50} para protioconazol, para os isolados coletados antes de 2010, antes da primeira recomendação de protioconazol na cultura da soja, foi de 3,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para protioconazol a maioria dos isolados foram completamente inibidos até a maior dose testada, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com exceção dos isolados 1412A, B, C, D e E (Tamarana, PR, coletados no ano de 2014), 1424 (Cascavel, PR, coletado no ano de 2014), 1434A (Boa Esperança, PR, coletado no ano de 2014), 1449B (Paiquerê, PR, coletado no ano de 2014) 1713A (Joanópolis, PR, coletado no ano de 2013), 1478A, B e D (Sorriso, MT, coletado no ano de 2014), que totalizaram 11% dos isolados coletados no estado do Paraná e 9% dos isolados coletados no estado do Mato Grosso que apresentaram $\text{CE}_{50} > 50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A CE_{50} variou de 0,0033 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 45,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média de 4,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para os isolados coletados no estado do Paraná, e de 0,0044 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 17,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média de 1,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para os isolados coletados no estado do Mato

Grosso. Sessenta e oito por cento dos isolados coletados no estado do Paraná e 78% dos isolados coletados no estado do Mato Grosso apresentaram $CE_{50} < 3,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, que é o valor de CE_{50} encontrada por Xavier et al. (2013) para os isolados coletados antes do ano de 2010 (Tabela 3.2). Vinte e dois por cento dos isolados do estado do Paraná não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu abaixo da menor dose avaliada ($0,0032 \mu\text{g mL}^{-1}$) (para 11% dos isolados) ou acima da maior dose avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (para 11% dos isolados). Para o estado do Mato Grosso, 18% dos isolados não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu abaixo da menor dose avaliada ($0,0032 \mu\text{g mL}^{-1}$) (para 9% dos isolados) ou acima da maior dose avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (para 9% dos isolados).

Em ambas as metodologias, os isolados com maior resistência a carbendazim foram coletados em 2008 no estado do Mato Grosso (MES 646) e em 2011 nos estados do Paraná e do Mato Grosso (MES 930, 931, 932 e 933).

O isolado MES 649 apresentou resistência moderada a carbendazim pelo teste de microtitulação colorimétrica e foi classificado como sensível pelo método ICM (XAVIER et al., 2013). Essa variação pode ter ocorrido em função da variabilidade de *C. cassiicola* e dos ensaios não terem sido instalados com amostras repicadas no mesmo momento. Fungos de reprodução assexuada, como no caso de *C. cassiicola*, não sofrem recombinações regulares e a variação genética resulta principalmente da acumulação de mutações espontâneas (TAYLOR; JACOBSON; FISHER, 1999), que pode ocorrer durante o processo de multiplicação do fungo em laboratório. Outra hipótese para explicar essa diferença pode ser o meio de cultura utilizado em cada metodologia. Na microtitulação colorimétrica utilizou-se o meio líquido YBA e no ICM utilizou-se o meio de cultura BDA. Segundo Griffin (1993), os meios de cultura podem determinar comportamentos distintos dos isolados, visto que o isolado pode metabolizar os nutrientes em velocidades diferentes, ocasionando a síntese de outras moléculas ou produtos que podem influenciar o crescimento do fungo.

Os isolados com maiores valores de CE_{50} (MES 930, 931, 932, 933) para protioconazol pela microtitulação foram os mesmos isolados com maiores valores no método de ICM.

Valores menores de CE_{50} , obtidos pelo método de microtitulação colorimétrica, podem ser devido a esse método usar meio nutriente líquido, o que pode afetar a relação dose-resposta entre o fungo e a concentração do fungicida,

por aumentar a superfície de contato entre este e o esporo do fungo. Além disso, neste método os esporos do fungo ficam totalmente imersos na solução com fungicida, ao contrário do método de ICM no qual uma parte da colônia do fungo fica sobre o meio de cultura sólido com fungicida (RAPOSO et al., 2015).

O método de microtitulação colorimétrica vem sendo recomendado pelo FRAC para testar a sensibilidade de *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Microdochium nivale*, *Phytophthora infestans*, *Plasmopara viticola*, *Oculimacula* spp., *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Rhynchosporium secalis* e *Mycosphaerella graminicola* a diferentes grupos de fungicidas (FRAC, 2015). Esse método vem sendo adotado por ser uma técnica simples, precisa, rápida e capaz de processar um grande número de amostras em curto espaço de tempo (RAPOSO et al., 2015; VEJA et al., 2012; RAMPERSAD, 2011; STAMMLER; BENZINGER; SPEAKMAN, 2007; STAMMLER; SPEAKMAN, 2006). A contaminação microbiana nas células da microplaca pode ocorrer e podem ser detectadas pelo aumento anormal na absorbância, enquanto que essa contaminação é mais difícil de ser detectada com o método ICM. Por esse motivo, repetições nas células da microplacas são sempre recomendadas.

No teste de monitoramento de sensibilidade do fungo *C. cassiicola* a fungicidas IDM, MBC e IQo, foi observada diferença na sensibilidade do fungo aos fungicidas testados.

Resistência do fungo *C. cassiicola*, isolado de folhas de soja, a MBCs tem sido relatada nos últimos anos no Brasil em diferentes regiões produtoras (AVOZANI, 2011; TERAMOTO et al., 2012; XAVIER et al., 2013). Apesar da baixa eficiência, os MBCs representaram 6% das recomendações para o controle das enfermidades na soja em 2012 no Brasil, correspondendo a 10,6 mil toneladas do volume de fungicidas comercializados (KLEFFMANN, 2012).

Avozani (2011) estudando a sensibilidade de cinco isolados de *C. cassiicola* da soja (três do Mato Grosso, um de Minas Gerais e um de Rondônia, Brasil) para carbendazim, observou valores de CE_{50} de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados coletados no estado de Minas Gerais e Rondônia respectivamente, e maior do que $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (maior dose avaliada) para o isolado do Mato Grosso, ressaltando a ocorrência de isolados resistentes ao fungicida MBC no estado do Mato Grosso.

Xavier et al., (2013), estudando a sensibilidade de 24 isolados de *C. cassiicola*, observaram isolados altamente resistentes a carbendazim ($CE_{50} \geq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) coletados no estado do Mato Grosso em 2008, e do Paraná e Mato Grosso em 2011. Para o protioconazol, os autores encontraram valores de CE_{50} que variaram de $0,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $26,44 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes dados se aproximam dos obtidos no presente trabalho, onde 68% dos isolados coletados no estado do Paraná e 88% coletados no estado do Mato Grosso foram considerados altamente resistente ao carbendazim.

Resultado semelhante para o fungicida carbendazim foi encontrado por Hasama (1991), que concluiu que a efetividade dos fungicidas benzimidazóis contra a doença também tem diminuído. Para tanto, testou a sensibilidade de 419 isolados de *C. cassiicola* coletados em campos de pepino, a benomil e carbendazim, verificando que 330 foram altamente resistentes a valores maiores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. O mesmo autor relata que não existiu diferença morfológica entre os isolados sensíveis e os resistentes a esses fungicidas.

Com relação à sensibilidade de *C. cassiicola* a fungicidas IDM, Avozani (2011) encontrou para os quatro fungicidas avaliados, utilizando a metodologia de inibição do crescimento micelial, valores de CE_{50} que variaram de $0,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $20,32 \mu\text{g mL}^{-1}$. A variação de CE_{50} para protioconazol foi semelhante ao observado no presente trabalho ($0,0033 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $45,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados do estado do Paraná e $0,0044 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $17,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados do Mato Grosso).

Os valores de sensibilidade de *C. cassiicola* a carbendazim e aos fungicidas IDM, obtidos por Avozani (2011) se aproximam dos valores obtidos no presente trabalho, sendo que a autora também não verificou perda da sensibilidade dos isolados aos fungicidas IDM, e sim redução da sensibilidade para alguns isolados de *C. cassiicola*, e encontrou isolados insensíveis ao fungicida benzimidazol. A alteração na sensibilidade de fungos aos fungicidas IDM é um fenômeno quantitativo (GHINI; KIMATI, 2000; REIS; REIS; CARMONA, 2010), caracterizando-se por redução gradativa da eficácia, eventualmente recuperada pelo uso de doses mais elevadas.

Date et al. (2004) testando a sensibilidade de 193 isolados de *C. cassiicola* isolados de pepino, com o método da mínima concentração inibitória, concluíram que 29 isolados foram altamente resistentes ao tiofanato metílico, pertencente ao grupo MBCs, e um isolado foi altamente resistente ao azoxistrobina,

pertencente ao grupo QoI. A detecção da redução da sensibilidade de *C. cassiicola* a MBCs também foi relatada na cultura do tomate, em Okayama, no Japão. No presente trabalho também foram observados isolados de *C. cassiicola*, isolados de plantas de soja, resistentes ao fungicida piraclostrobina (grupo IQo), sendo que 99% e 82% dos isolados coletados respectivamente no estado do Paraná e Mato Grosso, foram considerados altamente resistentes.

Teramoto et al. (2011) avaliaram a sensibilidade de seis isolados de *C. cassiicola* obtidos do pepino (cinco de São Paulo e um de Goiás, Brasil), utilizando-se a metodologia de inibição do crescimento micelial, encontrou valores de $CE_{50} > 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxistrobina (grupo dos IQo), carbendazim e tiofanato-metilo (grupo dos MBC) e $CE_{50} < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para difenoconazol e tebuconazol (grupo dos IDM). Estes resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, onde foi observada a ocorrência de isolados de *C. cassiicola* resistente a carbendazim e piraclostrobina, na região do Paraná e Mato Grosso. Para o protioconazol (IDM), não foram observadas mudanças no pico de sensibilidade do fungo em relação às populações de anos anteriores, sendo que 68% dos isolados coletados no estado do Paraná e 78% coletados no estado do Mato Grosso, durante a safra 2013 e 2014, apresentaram $CE_{50} < 3,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CE_{50} encontrada por Xavier et al., 2013, para os isolados coletados antes do ano de 2010, antes da primeira recomendação de protioconazol no campo).

De acordo com os dados sumarizados dos ensaios cooperativos de eficiência de fungicida para o controle da mancha-alvo da soja, durante a safra 2013/2014, foi observado que de forma semelhante aos resultados das safras 2011/12 e 2012/13, o fungicida carbendazim apresentou a menor eficiência no controle da doença entre os fungicidas avaliados (GODOY et al., 2014).

Tabela 3.2 – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado, País	Protioconazol	Carbendazim	Piraclostrobina		
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade
1163A	2013	Londrina, PR, Brasil	0,0109	0,0157	S	30,9472	AR
1163B	2013	Londrina, PR, Brasil	<0,0032	0,0149	S	35,5221	AR
1163C	2013	Londrina, PR, Brasil	0,0124	0,0048	S	44,7814	AR
1163D	2013	Londrina, PR, Brasil	0,0177	0,0185	S	22,6993	AR
1163E	2013	Londrina, PR, Brasil	0,0054	0,0186	S	35,0000	AR
1196A	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,0330	<0,0032	S	>50	AR
1196B	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,0060	>50	AR	>50	AR
1196C	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,0549	6,4500	MR	>50	AR
1196D	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,0255	<0,0032	S	>50	AR
1196E	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,0259	<0,0032	S	>50	AR
1197A	2013	Campo Mourão, PR, Brasil	16,3204	>50	AR	>50	AR
1197B	2013	Campo Mourão, PR, Brasil	0,0478	>50	AR	>50	AR
1197C	2013	Campo Mourão, PR, Brasil	0,1161	>50	AR	>50	AR
1197D	2013	Campo Mourão, PR, Brasil	0,0292	>50	AR	>50	AR
1997E	2013	Campo Mourão, PR, Brasil	0,6490	>50	AR	>50	AR
1198A	2013	Janiópolis, PR, Brasil	0,0287	>50	AR	>50	AR
1198B	2013	Janiópolis, PR, Brasil	0,1570	>50	AR	>50	AR
1198C	2013	Janiópolis, PR, Brasil	1,9620	>50	AR	>50	AR
1198D	2013	Janiópolis, PR, Brasil	0,2134	>50	AR	>50	AR
1198E	2013	Janiópolis, PR, Brasil	21,7700	>50	AR	>50	AR
1205A	2013	Arapongas, PR, Brasil	4,1053	1,4938	MR	>50	AR
1205B	2013	Arapongas, PR, Brasil	0,1503	>50	AR	39,4265	AR
1205C	2013	Arapongas, PR, Brasil	0,2413	>50	AR	>50	AR

Tabela 3.2 – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado, País	Protioconazol	Carbendazim	Sensibilidade	Piraclostrobina	Sensibilidade
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
1205D	2013	Arapongas, PR, Brasil	0,0098	>50	AR	>50	AR
1205E	2013	Arapongas, PR, Brasil	21,7300	>50	AR	>50	AR
1412A	2014	Tamarana, PR, Brasil	>50	<0,0032	S	>50	AR
1412B	2014	Tamarana, PR, Brasil	>50	0,0179	S	>50	AR
1412C	2014	Tamarana, PR, Brasil	>50	0,0361	S	>50	AR
1412D	2014	Tamarana, PR, Brasil	>50	0,0210	S	>50	AR
1412E	2014	Tamarana, PR, Brasil	>50	0,2590	S	>50	AR
1415A	2014	Mauá da Serra, PR, Brasil	14,6000	>50	AR	>50	AR
1415B	2014	Mauá da Serra, PR, Brasil	12,1600	>50	AR	41,1103	AR
1415C	2014	Mauá da Serra, PR, Brasil	23,4430	>50	AR	45,6482	AR
1415D	2014	Mauá da Serra, PR, Brasil	0,0882	>50	AR	12,3782	AR
1415E	2014	Mauá da Serra, PR, Brasil	11,2300	>50	AR	>50	AR
1424	2014	Cascavel, PR, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1434A	2014	Boa Esperança, PR, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1434B	2014	Boa Esperança, PR, Brasil	1,7500	>50	AR	24,7500	AR
1434C	2014	Boa Esperança, PR, Brasil	43,7379	>50	AR	>50	AR
1434D	2014	Boa Esperança, PR, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1434E	2014	Boa Esperança, PR, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1443A	2014	Cruz Maltina, PR, Brasil	>50	>50	AR	30,0753	AR
1443B	2014	Cruz Maltina, PR, Brasil	0,9676	<0,0032	S	4,1756	MR
1443C	2014	Cruz Maltina, PR, Brasil	21,6104	<0,0032	S	35,8763	AR

Tabela 3.2 – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado, País	Protioconazol	Carbendazim	Sensibilidade	Piraclostrobina	Sensibilidade
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
1443D	2014	Cruz Maltina, PR, Brasil	<0,0032	0,0539	S	>50	AR
1443E	2014	Cruz Maltina, PR, Brasil	0,1436	>50	AR	>50	AR
1449A	2014	Paiquerê, PR, Brasil	6,6521	>50	AR	>50	AR
1449B	2014	Paiquerê, PR, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1449C	2014	Paiquerê, PR, Brasil	27,7100	>50	AR	>50	AR
1449D	2014	Paiquerê, PR, Brasil	19,3034	>50	AR	>50	AR
1449E	2014	Paiquerê, PR, Brasil	21,9438	>50	AR	>50	AR
1469A	2014	Arapuã, PR, Brasil	0,3895	>50	AR	17,4614	AR
1469B	2014	Arapuã, PR, Brasil	0,2394	>50	AR	44,9164	AR
1469C	2014	Arapuã, PR, Brasil	0,2924	>50	AR	>50	AR
1469D	2014	Arapuã, PR, Brasil	0,4477	>50	AR	>50	AR
1469E	2014	Arapuã, PR, Brasil	0,3269	>50	AR	20,1000	AR
1472A	2014	Londrina, PR, Brasil	0,0916	>50	AR	>50	AR
1472B	2014	Londrina, PR, Brasil	0,0573	>50	AR	>50	AR
1472C	2014	Londrina, PR, Brasil	0,0510	>50	AR	15,3600	AR
1472D	2014	Londrina, PR, Brasil	0,1936	>50	AR	>50	AR
1472E	2014	Londrina, PR, Brasil	0,4371	>50	AR	>50	AR
1713A	2013	Janiópolis, PR, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1713B	2013	Janiópolis, PR, Brasil	45,1100	>50	AR	>50	AR
1713C	2013	Janiópolis, PR, Brasil	35,8900	>50	AR	>50	AR
1713D	2013	Janiópolis, PR, Brasil	7,3300	>50	AR	>50	AR

Tabela 3.2 – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado, País	Protioconazol	Carbendazim	Sensibilidade	Piraclostrobina	Sensibilidade
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
1713E	2013	Janiópolis, PR, Brasil	4,0600	>50	AR	>50	AR
2313A	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,0377	>50	AR	>50	AR
2313B	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,0195	>50	AR	28,6446	AR
2313C	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,0141	3,4700	MR	>50	AR
2313D	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,5851	>50	AR	39,6832	AR
2313E	2013	Boa Esperança, PR, Brasil	0,1023	0,0045	S	>50	AR
2713A	2013	São José dos Pinhais, PR, Brasil	0,0103	>50	AR	>50	AR
2713B	2013	São José dos Pinhais, PR, Brasil	0,0033	>50	AR	24,7400	AR
2713C	2013	São José dos Pinhais, PR, Brasil	0,0050	>50	AR	>50	AR
2713D	2013	São José dos Pinhais, PR, Brasil	<0,0032	>50	AR	>50	AR
2713E	2013	São José dos Pinhais, PR, Brasil	<0,0032	>50	AR	>50	AR
6413A	2013	Arapongas, PR, Brasil	0,3652	>50	AR	>50	AR
6413B	2013	Arapongas, PR, Brasil	1,2700	<0,0032	S	>50	AR
6413C	2013	Arapongas, PR, Brasil	<0,0032	<0,0032	S	32,8356	AR
6413D	2013	Arapongas, PR, Brasil	0,1005	>50	AR	>50	AR
6413E	2013	Arapongas, PR, Brasil	0,0484	>50	AR	>50	AR
6613A	2013	Mauá da Serra, PR, Brasil	0,0043	<0,0032	S	>50	AR
6613B	2013	Mauá da Serra, PR, Brasil	<0,0032	<0,0032	S	19,1974	AR
6613C	2013	Mauá da Serra, PR, Brasil	<0,0032	<0,0032	S	17,4000	AR
6613D	2013	Mauá da Serra, PR, Brasil	<0,0032	0,0035	S	>50	AR
6613E	2013	Mauá da Serra, PR, Brasil	0,0033	0,0050	S	>50	AR

Tabela 3.2 – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado, País	Protioconazol	Carbendazim	Sensibilidade	Piraclostrobina	Sensibilidade
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
6913A	2013	Grandes Rios, PR, Brasil	0,0276	>50	AR	>50	AR
6913B	2013	Grandes Rios, PR, Brasil	0,1158	>50	AR	>50	AR
6913C	2013	Grandes Rios, PR, Brasil	0,0319	>50	AR	>50	AR
6913D	2013	Grandes Rios, PR, Brasil	0,0252	>50	AR	>50	AR
6913E	2013	Grandes Rios, PR, Brasil	0,0613	>50	AR	11,1953	AR
8613A	2013	Tamarana, PR, Brasil	0,5080	<0,0032	S	21,1400	AR
8613B	2013	Tamarana, PR, Brasil	0,3593	<0,0032	S	>50	AR
8613C	2013	Tamarana, PR, Brasil	1,3400	<0,0032	S	>50	AR
8613D	2013	Tamarana, PR, Brasil	0,1310	<0,0032	S	>50	AR
8613E	2013	Tamarana, PR, Brasil	0,0338	>50	AR	>50	AR
9513A	2013	Cruzmaltina, PR, Brasil	0,0006	0,5798	S	24,7038	AR
9513B	2013	Cruzmaltina, PR, Brasil	<0,0032	>50	AR	40,9800	AR
9513C	2013	Cruzmaltina, PR, Brasil	<0,0032	14,2700	AR	>50	AR
9513D	2013	Cruzmaltina, PR, Brasil	<0,0032	>50	AR	>50	AR
9513E	2013	Cruzmaltina, PR, Brasil	<0,0032	>50	AR	12,5741	AR
6313A	2013	Jaciara, MT, Brasil	0,0044	0,6908	S	>50	AR
6313B	2013	Jaciara, MT, Brasil	0,0203	<0,0032	S	>50	AR
6313C	2013	Jaciara, MT, Brasil	<0,0032	>50	AR	14,2617	AR
6313D	2013	Jaciara, MT, Brasil	0,0360	>50	AR	>50	AR
6313E	2013	Jaciara	0,0102	<0,0032	S	13,7069	AR
5113A	2013	Primavera do Leste, MT, Brasil	<0,0032	>50	AR	>50	AR

Tabela 3.2 – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado, País	Protioconazol	Carbendazim	Sensibilidade	Piraclostrobina	Sensibilidade
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
5713A	2013	Sorriso, MT, Brasil	<0,0032	>50	AR	>50	AR
1460		Aral Moreira, MT, Brasil	11,410	>50	AR	>50	AR
1478A	2014	Sorriso, MT, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1478B	2014	Sorriso, MT, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1478D	2014	Sorriso, MT, Brasil	>50	>50	AR	>50	AR
1478E	2014	Sorriso, MT, Brasil	17,700	>50	AR	0,29506	S
1473A	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	0,269	>50	AR	15,5216	AR
1473B	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	1,1141	>50	AR	16,32	AR
1473C	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	0,4610	>50	AR	20,4336	AR
1473D	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	0,4573	>50	AR	25,57	AR
1473E	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	0,0380	>50	AR	1,63	MR
1474A	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,2572	>50	AR	0,99596	S
1474B	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,0296	>50	AR	7,81	MR
1474C	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,0156	>50	AR	6,388	AR
1474D	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,0373	2,66	MR	0,12	S
1474E	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,1195	>50	AR	0,4713	S
1479A	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	4,254	>50	AR	>50	AR
1479B	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	0,139	>50	AR	>50	AR
1479C	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	0,464	>50	AR	>50	AR
1479D	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	0,176	>50	AR	13,823	AR
1479E	2014	Nova Mutum, MT, Brasil	0,092	>50	AR	>50	AR

Tabela 3.2 – Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado, País	Protioconazol	Carbendazim	Piraclostrobina		
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade
1480 ^a	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,2046	>50	AR	>50	AR
1480B	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,0445	>50	AR	15,5883	AR
1480C	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,5308	>50	AR	>50	AR
1480D	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,0023	>50	AR	>50	AR
1480E	2014	Sorriso, MT, Brasil	0,0055	>50	AR	31,03	AR
1485A	2014	Rio Verde, MT, Brasil	13,62	>50	AR	>50	AR

AR – Altamente resistente, $CE_{50} \geq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; MR - moderadamente resistente, $CE_{50} > 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; S - Sensível, $CE_{50} \leq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Fonte: o próprio autor

3.6 CONCLUSÓES

A método de microtitulação colorimétrica foi adequada para determinar a sensibilidade de *C. cassicola* aos fungicidas carbendazim e protioconazole.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a menor eficiência de controle da mancha-alvo na soja pode estar associada à presença de isolados do fungo resistentes aos fungicidas MBC e IQo.

4 ARTIGO B: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* spp. ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA E O MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DO FUNGO A FUNGICIDAS INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO, METIL BENZIMIDAZOL CARBAMATO E INIBIDORES DA QUINONA OXIDASE.

4.1 RESUMO

O patógeno comumente associado à antracnose em soja é o fungo *Colletotrichum truncatum*, porém outras espécies do gênero *Colletotrichum* têm sido relatadas. Estudos recentes indicaram limitada eficácia do controle químico da antracnose da soja, sendo que uma das hipóteses pode ser a baixa sensibilidade do patógeno aos princípios ativos testados ou a variabilidade das populações de *Colletotrichum* spp. O objetivo desse trabalho foi identificar as espécies de *Colletotrichum* obtidos de plantas de soja coletadas no Paraná, durante a safra 2012/13, por meio de análises morfológicas, avaliar a patogenicidade e a sensibilidade para os fungicidas metil benzimidazol carbamato (MBC), inibidores da quinona oxidase (IQo) e inibidores da desmetilação (IDM), comparando com isolados depositados na Micoteca da Embrapa Soja (MES), coletados de 1992 a 2011. Na análise morfológica, foi avaliada o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM); coloração da colônia, borda e reverso da colônia em meio de cultura BDA; presença de peritécio, acérvulo e massa conidial; tamanho e forma dos esporos; e severidade em folhas de soja destacadas. Para o teste de sensibilidade de *C. truncatum*, os fungicidas selecionados foram utilizados nas concentrações de 0; 0,0032; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pelo teste de microtitulação colorimétrica. Foram feitas comparações com os valores de CE_{50} dos fungos depositados na MES, coletados antes do uso intensivo de fungicidas. Os 87 isolados de *Colletotrichum* spp., foram classificados como pertencentes a espécie *G. glycines* ou a fase anamorfica *C. truncatum*, destes 29 foram patogênicos a soja. A análise de agrupamento de dados separa os isolados em 15 e 16 grupos para os experimentos 1 e 2, respectivamente, e não é possível diferenciar os isolados de *Colletotrichum* como patogênicos ou não patogênicos à soja, levando em consideração seus próprios atributos qualitativos e quantitativos. Os isolados patogênicos foram utilizados no teste de monitoramento de sensibilidade. As CE_{50} para carbendazim variaram de 1,89 a 2,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para

piraclostrobina variaram de de 0,36 a 5,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e para o protioconazol variaram de 0,051 a 4,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média 1,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

PALAVRAS-CHAVE: antracnose, benzimidazol, estrobilurinas, morfologia de esporos, triazol.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION, PATHOGENICITY OF *Colletotrichum* spp. SPECIES ISOLATES FROM SOYBEAN AND SENSITIVITY MONITORING OF FUNGUS TOWARD DEMETHYLATION INHIBITORS, METHYL BENZIMIDAZOLE CARBAMATES AND QUINONE OUTSIDE INHIBITORS FUNGICIDES

4.2 ABSTRACT

The pathogen commonly associated with anthracnose of soybean is *Colletotrichum truncatum* but other species of genus *Colletotrichum* have been reported. Recent studies indicate limited effectiveness of chemical control of soybean anthracnose, and one hypothesis may be the low sensitivity of the pathogen to active principles tested or the variability of populations of *Colletotrichum* spp. The objective of this study was to identify the species of *Colletotrichum* isolated from soybean in Parana during the 2012/13 growing season using morphological analysis, evaluate the pathogenicity and sensitivity to methyl benzimidazole carbamates (MBC), quinone outside inhibitors (QoI) and demethylation inhibitors (DMI) fungicides, compared to isolates deposited in Embrapa Soja Collection (MES), collected from 1992 to 2011. In the morphological analysis, the mycelial growth rate index (IVCM) was evaluated; colors, border and reverse colony staining in BDA culture medium; presence of perithecium, acervulum and conidial mass; size and shape of the spores; and severity in leaves highlighted. For susceptibility testing of *C. truncatum*, the selected fungicides were used at concentrations of 0; 0.0032; 0.016; 0.08; 0.4; 2; 10 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the microtiter method test. Comparisons were made with EC_{50} values of fungi deposited in MES, collected prior to the intensive use of fungicides. The 87 isolates of *Colletotrichum* spp. were classified as belonging to *G. glycines* species or the anamorphic *C. truncatum*, these 29 were pathogenic to soybean. Data collection analysis separates isolates in 15 and 16 groups for experiments 1 and 2, respectively, and it is not possible to differentiate the isolates of *Colletotrichum* spp. as pathogenic or non-pathogenic to soybean, taking into account their own qualitative and quantitative attributes. Pathogenic isolates were used without the sensitivity monitoring test. The EC_{50} for carbendazim ranged from 1.89 to 2.93 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for pyraclostrobin range from 0.36 to 5.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and prothioconazole the range from 0.051 to 4.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean 1.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

KEYWORDS: anthracnose, benzimidazole, strobilurins, spore morphology, triazole.

4.3 INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] está entre as atividades econômicas de destaque na América do Sul, com crescimento expressivo da área cultivada nas últimas décadas. Juntamente com a evolução de área, os problemas com doenças se intensificaram devido a fatores como cultivo em áreas extensas (monocultura), ausência de rotação de culturas, utilização de cultivares suscetíveis e introdução de novas doenças. Uma das doenças favorecidas por essa condição de cultivo da soja é a antracnose que causa danos de 15% a 20% no rendimento de grãos, especialmente na região central e norte do Brasil. Nessas regiões as condições climáticas (temperatura superior a 25° C e tempo de molhamento foliar superior a 24 h) são favoráveis à doença (EMBRAPA, 2010).

O fungo *Colletotrichum* spp., é o agente causal da antracnose que incide em uma ampla variedade de plantas (MORIWAKI; TSUKIBOSHI; SATO, 2002). O patógeno comumente encontrado causando antracnose em soja é a forma anamórfica do fungo *Colletotrichum truncatum* (Schwein,) Andrus & W. D. Moore, porém várias outras espécies de *Colletotrichum* têm sido relatadas, incluindo *C. coccodes*, *C. destructivum* (teleomorfo, *Glomerella glycines*), *C. gloeosporioides* (teleomorfo, *G. cingulata*), *C. graminicola* (teleomorfo, *G. graminicola*) (YANG; HARTMAN, 2011). Hartman, Manandhar e Sinclair (1986), relatam a observação de estruturas reprodutivas do gênero *Colletotrichum* e de sua forma teleomórfica *Glomerella* em 22% de 5000 amostras de soja coletadas em campo. No entanto, espécies não patogênicas do gênero *Colletotrichum* são frequentemente isoladas de tecidos necrosados e erroneamente atribuídas como agente causal da necrose.

Espécies de *Colletotrichum* spp. são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Características como morfologia de conídios, presença de setas, peritécio e coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento têm sido usadas para diferenciar espécies morfológicamente próximas, como por exemplo, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* J. H. Simmonds (SUTTON, 1992). Características morfológicas, como tamanho e forma de conídios e formato de apressórios, permitiu a Goes e Kimati (1997), diferenciar três grupos de *Colletotrichum* associados à queda prematura dos frutos cítricos, e permitiu a Tozze-Júnior, Mello e Massola-Júnior (2006) diferenciarem *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* associados à antracnose em pimenta, pimentão e jiló.

Dentre as medidas recomendadas para a redução da incidência da antracnose estão a rotação de culturas, o maior espaçamento entre linhas, a utilização de população adequada de plantas, o tratamento químico e o manejo adequado do solo (EMBRAPA, 2010).

As aplicações de fungicidas em soja visam principalmente o controle da ferrugem e são mais frequentes na fase reprodutiva da cultura. Já a antracnose tem como suas principais fontes de inóculo as sementes infectadas e os restos culturais, sendo uma das primeiras doenças a se estabelecer na cultura, com aparecimento de lesões em cotilédones. Estudos de campo, conduzidos em áreas comerciais em Planaltina, DF, registraram incidência média de 24% de lesões típicas de antracnose em cotilédones (DIAS et al., 2011b). Segundo Yorinori et al., (2000) *C. truncatum* e outros fungos fitopatogênicos estão associados com a parte aérea da soja muito antes do aparecimento de sintomas da doença.

Experimentalmente foi observada a eficiência de controle da antracnose com alguns fungicidas do grupo dos benzimidazóis isoladamente ou em mistura com triazóis. Entretanto, relatos de perdas significativas de produção devido à antracnose continuam a ser registrados em soja, especialmente nas regiões Norte e Centro-Oeste. Estudos recentes indicaram limitada eficácia do controle químico desta doença (DIAS et al., 2011a; SOUZA, 2009). Entre as causas podem ser citadas a baixa sensibilidade do patógeno aos princípios ativos testados ou da variabilidade das populações de *Colletotrichum* spp. associadas à antracnose da soja, que pode envolver mais de uma espécie (HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999).

Estudos realizados por Dias (2014) visando avaliar a eficiência de fungicidas e perdas de produtividade causadas pela antracnose da soja mostraram que os melhores tratamentos fungicidas foram aqueles combinando princípios ativos triazóis e estrobirulinas, tanto na redução da incidência da doença quanto no aumento da produtividade.

No Brasil, os problemas de resistência ou menor sensibilidade de fungos na cultura da soja têm sido observados após falha de controle com fungicidas no campo. Os programas de monitoramento de resistência no Brasil são conduzidos por empresas filiadas ao FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). Na cultura da soja, está restrito ao monitoramento de *P. pachyrhizi* (CALEGARI et al., 2009; KOGA; LOPES; GODOY, 2011; GODOY, 2011; SCHMITZ et al., 2013; XAVIER et

a., 2015) e, mais recentemente, de *C. cassicola* (AVOZANI, 2011; TERAMOTO et al., 2012; XAVIER et al., 2013).

O objetivo do trabalho foi identificar espécies de *Colletotrichum* spp. através de análises morfológicas, avaliar a patogenicidade e a sensibilidade de populações do fungo coletadas no estado do Paraná na safra 2012/13 para os fungicidas metil benzimidazol carbamato (MBC), inibidores da quinona oxidase (IQo) e inibidores da desmetilação (IDM) e comparar com as respostas dos isolados depositados na Micoteca da Embrapa Soja (MES) coletados de 1992-2011.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 42 isolados de *Colletotrichum* spp. e de sua fase teleomórfica *G. glycines* obtidos na MES e 45 isolados obtidos de folhas de soja infectadas e coletadas em lavouras do estado do Paraná, durante a safra 2012/13 (Tabela 4.1).

Os isolamentos foram realizados a partir de lesões típicas da antracnose. Tecidos infectados do hospedeiro foram seccionados em pequenos fragmentos, posteriormente foi realizada a desinfestação superficial dos fragmentos em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 0,1% de Cl_2 por 1 minuto e água destilada por 1 minuto. Com o auxílio de uma pinça flambada os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (20 g de dextrose, 15 g de agar, e infusão de 200 g de batata em 1 L de água destilada) com estreptomicina ($0,03 \text{ g L}^{-1}$).

Discos de micélio de 5 mm de diâmetro, da cultura monospórica de cada isolado, foram retirados a partir da borda de uma colônia com aproximadamente 10 dias e transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA e mantidos a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento e esporulação do fungo, aproximadamente 10 dias após repicagem, foram caracterizados morfológicamente 87 isolados de *Colletotrichum* spp., os caracteres avaliados foram: índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM); coloração da colônia, borda e reverso da colônia em meio de cultura BDA; presença de peritécio, acérvulo e massa conidial; tamanho e forma dos esporos classificadas em agudo, arredondado e clavado; e severidade em folhas de soja destacadas.

A velocidade de crescimento micelial (VCM) foi determinado aos 5, 7 e 9 dias de cultivo a 22° C, em BDA, pela média de duas medidas no sentido perpendicular entre si, passando pelo centro da colônia, com o auxílio de régua. O IVCM foi calculado conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991): $IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$, sendo: D = diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de dias após a inoculação. A avaliação da coloração da colônia em meio de cultura BDA e a formação de acérvulo ou peritécio foi realizada segundo metodologia proposta por Yang e Hartman (2011). Com cinco repetições por isolado, cada placa correspondendo a uma repetição, adotando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os experimentos foram repetidos. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

Na avaliação da morfologia dos esporos, tamanho e formato, foram confeccionadas lâminas semi-permanentes em lacto-glicerol. Posteriormente, estas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz Leica® DM 2500 provido de câmara Leica® DFC 490, acoplada a um sistema eletrônico de captura de imagem. A mensuração dos esporos foram realizadas com 50 repetições, através do programa Leica® Qwin, medindo o comprimento e a largura dos esporos. Foi observado o formato do ápice dos esporos e classificados como, arredondado, agudo ou clavado (CASTILHO; REIS; HENZ, 2007). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. O experimento foi repetido. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

Para avaliação de severidade, a suspensão de esporos de *Colletotrichum* spp. foi padronizada para 10^5 esporos mL^{-1} e inoculada nas folhas destacadas de soja. Foram utilizados os folíolos centrais do primeiro trifólio, sentido base-ápice, da cultivar de soja BMX Potência RR. Foram acondicionados dois folíolos por placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo dois papéis absorventes saturados com água destilada, com a face adaxial voltada para cima. A inoculação dos folíolos com a suspensão de esporos foi realizada com auxílio de borrifador. As placas foram acondicionadas em saco plástico umedecido e incubadas em câmara de crescimento, com temperatura de $23 \pm 2^\circ C$, com 12 horas de fotoperíodo e umidade relativa mínima do ar de 60%. As avaliações de severidade foram realizadas após 14 dias com o auxílio da escala diagramática para antracnose do

feijoeiro (adaptada de GODOY et al., 1997). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 87 tratamentos (isolados de *Colletotrichum* spp.) e quatro repetições, cada placa correspondendo a uma repetição. O experimento foi repetido. Os dados de severidade foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os isolados patogênicos foram utilizados no teste de sensibilidade a fungicidas.

Os dados de IVCM; coloração de colônia; presença de acérvulo, peritécio ou massa conidial; morfologia de esporos, tamanho e formato; e severidade (Tabela 4.2), foram submetidos a análise de agrupamento de dados. A análise de agrupamento foi realizada pelo método SINGLE, onde a distância entre dois clusters é dada pela distância entre os seus pontos mais próximos, com o auxílio do programa SAS® Versão 9.1.3 (2013). O experimento foi repetido.

Para o monitoramento da sensibilidade de *Colletotrichum* spp. foram utilizadas 15 isolados monospóricos depositados na Micoteca da Embrapa Soja (MES) obtidos de amostras de folhas, vagens e caules de soja infectadas provenientes de lavouras de todo o Brasil entre 1992-2011 e 14 isolados monospóricos coletados no estado do Paraná durante a safra 2012/13 (Tabela 4.3).

Esporos de *Colletotrichum* spp. foram obtidos através da transferência de um disco de micélio de 5 mm diâmetro retirado a partir da borda de uma colônia com aproximadamente 10 dias e transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a $25 \pm 2^\circ$ C fotoperíodo de 12 horas durante sete dias, para possibilitar o crescimento da colônia e posteriormente foram mantidas em temperatura ambiente sob luz contínua por três dias para estimular a esporulação. Os esporos foram coletados adicionando 8 mL do meio de cultura Yeast Bacto Acetato (YBA) (10 g extrato de levedura, 10 g bacto peptona, 20 g de acetato de sódio (pm: 82,03) em 500 mL de água destilada e autoclavada) e esfregando-os com uma lâmina estéril. A suspensão de esporos obtida foi filtrada em gaze esterilizada e a concentração ajustada para 10^5 esporos mL^{-1} com auxílio de um hemacitômetro. Foi adicionando estreptomicina ($0,03 \text{ g L}^{-1}$) ao meio YBA para reduzir a contaminação.

Formulações comerciais de carbendazim [50% de ingrediente ativo (ia), Carbendazim Nortox®; Nortox SA], protioconazol (48% ia, Proline®; Bayer CropScience) e piraclostrobina (25% ia, Comet®; Basf) foram usadas nos experimentos.

Para o teste de sensibilidade de *Colletotrichum* spp., os isolados foram avaliados com os fungicidas nas concentrações de 0; 0,0032; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os fungicidas foram previamente preparados em solução estoque com água na concentração de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de diluições seriadas até obter as concentrações finais.

Para determinar a sensibilidade de cada isolado aos fungicidas pelo teste de microtitulação colorimétrica, foram adicionados 50 μL da suspensão de 10^5 esporos mL^{-1} em cada poço da microplaca (microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços, Kasvi), seguido da adição de 50 μL das diferentes concentrações do produto fungicida, num volume final de 100 μL . As concentrações foram distribuídas em linhas (8 concentrações) e os isolados em colunas, sendo realizadas 4 repetições por isolado (4 colunas). Cada microplaca foi composta de uma testemunha (branco), onde as concentrações eram adicionadas a 50 μL do meio de cultura YBA, e dois isolados. As microplacas foram tampadas, envoltas por filme plástico e colocadas em mesa agitadora por uma hora, para possibilitar a mistura dos produtos com a suspensão de esporos. As microplacas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 25°C, fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Os experimentos foram repetidos.

A absorvância foi medida em um leitor de microplacas (ASYS, Eugendorf, Austria) no comprimento de onda de 540 nm. O valor da absorvância final foi calculado pela subtração da absorvância da amostra branco (YBA + fungicida) da absorvância dos isolados.

Para calcular os valores de CE_{50} para cada isolado, foi utilizado o modelo de regressão linear probit entre porcentagem de controle relativo à absorvância da leitura no branco e logaritmo na base 10 das concentrações (doses) dos produtos. Foi verificada a existência de interação entre os experimentos e, na ausência, os dados foram analisados conjuntamente. Os parâmetros do modelo probit e as estimativas das CE_{50} foram obtidos utilizando a proc probit do sistema SAS® Versão 9.1.3 (2013). O coeficiente chi-quadrado de Pearson foi usado para verificar a qualidade do ajuste ($p > 0,01$). Os valores de CE_{50} foram relacionados aos valores obtidos dos isolados MES 287A, 287B e 287C, coletados antes do uso intensivo de fungicida em soja. Quando não foi possível estimar a CE_{50} em razão dos valores terem ocorridos abaixo e acima das maiores doses avaliadas, 0,0032 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, os valores foram fixados.

Tabela 4.1 – Código de identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp., ano e local de coleta dos isolados. Londrina, 2017.

Isolados	Ano	Município, estado e país
286A	06/03/1992	Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil
286B	06/03/1992	Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil
286C	06/03/1992	Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil
287A	22/05/1992	Balsas, Maranhão, Brasil
287B	22/05/1992	Balsas, Maranhão, Brasil
287C	22/05/1992	Balsas, Maranhão, Brasil
289A	28/08/2004	Boa Vista, Roraima, Brasil
289B	28/08/2004	Boa Vista, Roraima, Brasil
289C	28/08/2004	Boa Vista, Roraima, Brasil
290A	01/02/2005	Boa Vista, Roraima, Brasil
290B	01/02/2005	Boa Vista, Roraima, Brasil
290C	01/02/2005	Boa Vista, Roraima, Brasil
895A	02/2010	Laranjeira do sul, Paraná, Brasil
895B	02/2010	Laranjeira do sul, Paraná, Brasil
895C	02/2010	Laranjeira do sul, Paraná, Brasil
938A	05/04/2011	Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil
938B	05/04/2011	Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil
938C	05/04/2011	Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil
991A	15/02/2012	Jataizinho, Paraná, Brasil
991B	15/02/2012	Jataizinho, Paraná, Brasil
991C	15/02/2012	Jataizinho, Paraná, Brasil
661A		Francisco Beltrão, Paraná, Brasil
661B		Francisco Beltrão, Paraná, Brasil
661C		Francisco Beltrão, Paraná, Brasil
929A		Cascavel, Paraná, Brasil
929B		Cascavel, Paraná, Brasil
929C		Cascavel, Paraná, Brasil
1168A	18/02/2013	Borrazópolis, Paraná, Brasil
1168B	18/02/2013	Borrazópolis, Paraná, Brasil
1168C	18/02/2013	Borrazópolis, Paraná, Brasil
1172A		
1172B		
1172C		
1176A	15/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
1176B	15/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
1176C	15/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
1177A	15/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
1177B	15/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
1177C	15/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
1179A	20/02/2013	Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil
1179B	20/02/2013	Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil
1179C	20/02/2013	Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil
0313A	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil

Tabela 4.1 – Código de identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp., ano e local de coleta dos isolados. Londrina, 2017.

Isolados	Ano	Município, estado e país
0313 B	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
0313 C	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
0413A	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
0413B	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
0413C	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
0913A	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
0913B	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
0913C	05/02/2013	Londrina, Paraná, Brasil
1813A	17/01/2013	Campo Mourão, Paraná, Brasil
1813B	17/01/2013	Campo Mourão, Paraná, Brasil
1813C	17/01/2013	Campo Mourão, Paraná, Brasil
2013A	17/01/2013	Campo Mourão, Paraná, Brasil
2013B	17/01/2013	Campo Mourão, Paraná, Brasil
2013C	17/01/2013	Campo Mourão, Paraná, Brasil
2213A	17/01/2013	Boa Esperança, Paraná, Brasil
2213B	17/01/2013	Boa Esperança, Paraná, Brasil
2213C	17/01/2013	Boa Esperança, Paraná, Brasil
6213A	29/01/2013	Sorriso, Mato Grosso, Brasil
6213B	29/01/2013	Sorriso, Mato Grosso, Brasil
6213C	29/01/2013	Sorriso, Mato Grosso, Brasil
6813A	06/03/2013	Cruzmaltina, Paraná, Brasil
6813B	06/03/2013	Cruzmaltina, Paraná, Brasil
6813C	06/03/2013	Cruzmaltina, Paraná, Brasil
8613A	13/03/2013	Tamarana, Paraná, Brasil
8613B	13/03/2013	Tamarana, Paraná, Brasil
8613C	13/03/2013	Tamarana, Paraná, Brasil
8713A	13/03/2013	Tamarana, Paraná, Brasil
8713B	13/03/2013	Tamarana, Paraná, Brasil
8713C	13/03/2013	Tamarana, Paraná, Brasil
8813A	13/03/2013	Marilandia do Sul, Paraná, Brasil
8813B	13/03/2013	Marilandia do Sul, Paraná, Brasil
8813C	13/03/2013	Marilandia do Sul, Paraná, Brasil
8913A	13/03/2013	Faxinal, Paraná, Brasil
8913B	13/03/2013	Faxinal, Paraná, Brasil
8913C	13/03/2013	Faxinal, Paraná, Brasil
9513A	20/03/2013	Cruzmaltina, Paraná, Brasil
9513B	20/03/2013	Cruzmaltina, Paraná, Brasil
9513C	20/03/2013	Cruzmaltina, Paraná, Brasil
9713A	20/03/2013	Pitanga, Paraná, Brasil
9713B	20/03/2013	Pitanga, Paraná, Brasil
9713C	20/03/2013	Pitanga, Paraná, Brasil
10013A	12/03/2013	Ponta Grossa, Paraná, Brasil
10013B	12/03/2013	Ponta Grossa, Paraná, Brasil
10013C	12/03/2013	Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Fonte: o próprio autor

Tabela 4.2 – Código e características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no presente estudo. Londrina, 2017.

Isolados	IVCM (cm)	Coloração					Acervulo	Massa conidial	Comprimento (µm)	Esporos		Severidade (%)
		Colônia	Borda	Reverso	Peritécio	Largura (µm)				Ápices		
286A	3,66 e	cinza centro e cinza claro ao redor	cinza claro	cinza centro e cinza claro ao redor	ausente	ausente	laranja	21,68 d	2,90 l	Clavado	0,00 h	
286B	3,34 f	cinza centro e cinza claro ao redor	cinza claro	cinza centro e cinza claro ao redor	ausente	ausente	laranja	21,90 d	3,09 k	Clavado	0,00 h	
286C	2,38 g	cinza centro e cinza claro ao redor	cinza claro	cinza centro e cinza claro ao redor	ausente	ausente	laranja	21,56 d	2,99 k	Clavado	0,00 h	
287A	3,97 e	cinza claro	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	17,66 i	4,19 g	Clavado	6,75 b	
287B	3,71 e	cinza claro	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	15,30 l	4,12 g	Clavado	6,44 b	
287C	3,68 e	cinza claro	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	15,93 k	4,27 f	Clavado	7,31 a	
289A	3,55 e	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	laranja	20,01 f	3,00 k	Clavado	3,09 e	
289B	3,02 f	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	laranja	21,10 d	2,80 l	Clavado	3,38 e	
289C	2,92 f	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	laranja	20,61 e	2,92 l	Clavado	3,41 e	
290A	2,85 f	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	presente	ausente	ausente	21,50 d	2,70 m	Clavado	0,00 h	
290B	2,57 g	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	presente	ausente	ausente	21,35 d	2,64 m	Clavado	0,00 h	
290C	1,90 g	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	presente	ausente	ausente	21,35 d	2,67 m	Clavado	0,00 h	
895A	5,94 a	cinza	branca	Cinza	ausente	ausente	ausente	19,15 g	4,30 f	Clavado	0,00 h	
895B	5,77 b	cinza	branca	Cinza	ausente	ausente	ausente	17,43 i	4,34 f	Clavado	0,00 h	
895C	6,43 a	cinza	branca	Cinza	ausente	ausente	ausente	18,58 h	4,32 f	Clavado	0,00 h	
938A	4,63 d	cinza	branco	cinza claro	presente	ausente	ausente	11,24 m	4,19 g	arredondado	0,63 g	

Tabela 4.2 – Código e características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no presente estudo. Londrina, 2017.

Isolados	IVCM (cm)	Coloração					Esporos			Severidade (%)	
		Colônia	Borda	Reverso	Peritécio	Acervulo	Massa conidial	Comprimento (µm)	Largura (µm)		Ápices
938B	4,32 d	cinza	branco	cinza claro	ausente	ausente	ausente	10,75 m	5,24 c	arredondado	0,58 g
938C	4,41 d	cinza	branco	cinza claro	ausente	ausente	ausente	11,24 m	4,11 g	arredondado	0,63 g
991A	4,54 d	cinza escuro	cinza	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	22,20 d	2,98 k	Clavado	0,00 h
991B	4,49 d	cinza escuro	cinza	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	22,40 c	3,05 k	Clavado	0,00 h
991C	4,21 d	cinza escuro	cinza	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	20,30 e	3,23 j	Clavado	0,00 h
661A	5,32 c	cinza claro	branco	cinza claro	ausente	ausente	ausente	16,01 k	3,93 h	Clavado	0,00 h
661B	5,77 b	cinza claro	branco	cinza claro	ausente	ausente	ausente	15,14 l	3,68 i	Clavado	0,00 h
661C	5,96 a	cinza claro	branco	cinza claro	ausente	ausente	ausente	16,22 k	3,84 h	Clavado	0,00 h
929A	4,64 d	cinza	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	20,20 e	3,06 k	Clavado	0,00 h
929B	5,10 c	cinza	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	21,22 d	3,02 k	Clavado	0,00 h
929C	4,61 d	cinza	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	20,64 e	3,22 j	Clavado	0,00 h
1168A	5,51 b	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	21,05 d	3,02 k	Clavado	0,00 h
1168B	5,00 c	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	21,32 d	2,79 l	Clavado	0,00 h
1168C	5,52 b	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	21,19 d	2,92 l	Clavado	0,00 h
1172A	4,06 e	branco	branco	Branco	presente	ausente	ausente	21,40 d	2,74 m	Clavado	2,34 f
1172B	3,90 e	branco	branco	Branco	presente	ausente	ausente	21,72 d	2,49 m	Clavado	2,06 f
1172C	3,85 e	branco	branco	Branco	presente	ausente	ausente	21,59 d	2,62 m	Clavado	2,25 f
1176A	4,35 d	cinza	branco	Branco	presente	ausente	ausente	23,47 a	3,15 k	Clavado	0,00 h
1176B	4,24 d	cinza	branco	Branco	presente	ausente	ausente	23,90 a	3,23 j	Clavado	0,00 h

Tabela 4.2 – Código e características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no presente estudo. Londrina, 2017.

Isolados	IVCM (cm)	Coloração					Esporos			Severidade (%)	
		Colônia	Borda	Reverso	Peritécio	Acervulo	Massa conidial	Comprimento (µm)	Largura (µm)		Ápices
1176C	4,28 d	cinza	branco	Branco	presente	ausente	ausente	23,92 a	3,36 j	Clavado	0,00 h
1177A	5,02 c	cinza	branco	Branco	presente	ausente	salmão	24,13 a	3,40 j	Clavado	0,00 h
1177B	4,88 c	cinza	branco	Branco	presente	ausente	ausente	23,98 a	3,47 i	Clavado	0,00 h
1177C	4,85 c	cinza	branco	Branco	presente	ausente	ausente	24,16 a	3,56 i	Clavado	0,00 h
1179A	3,22 f	cinza escuro	branco	cinza claro	ausente	ausente	laranja	19,12 g	3,18 j	Clavado	4,63 d
1179B	2,54 g	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	laranja	19,05 g	3,38 j	Clavado	4,81 d
1179C	3,79 e	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	laranja	18,87 g	3,39 j	Clavado	5,25 c
0313A	5,60 b	cinza	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	17,95 i	6,36 a	arredondado	1,02 g
0313B	5,18 c	cinza	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	18,26 h	6,26 a	arredondado	0,00 h
0313C	4,63 d	cinza	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	17,29 i	6,33 a	arredondado	0,00 h
0413A	5,59 b	cinza	branco	Cinza	presente	ausente	ausente	15,56 l	5,50 b	arredondado	0,00 h
0413B	5,59 b	cinza	cinza claro	cinza escuro	presente	ausente	ausente	15,55 l	5,59 b	arredondado	0,00 h
0413C	4,85 c	cinza	cinza claro	cinza escuro	presente	ausente	ausente	16,47 j	5,60 b	arredondado	0,00 h
0913A	5,19 c	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	presente	ausente	18,65 h	5,49 b	arredondado	0,87 g
0913B	3,90 e	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	18,34 h	5,34 b	arredondado	1,05 g
0913C	4,86 c	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	18,64 h	5,50 b	arredondado	0,93 g

Tabela 4.2 – Código e características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no presente estudo. Londrina, 2017.

Isolados	IVCM (cm)	Coloração					Esporos			Severidade (%)	
		Colônia	Borda	Reverso	Peritécio	Acervulo	Massa conidial	Comprimento (µm)	Largura (µm)		Ápices
1813A	6,31 a	cinza	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	16,49 j	5,19 c	clavado	0,00 h
1813B	6,01 a	cinza	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	16,27 k	5,12 c	clavado	0,00 h
1813C	6,22 a	cinza	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	16,79 j	5,14 c	clavado	0,00 h
2013A	5,50 b	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	18,72 h	5,22 c	clavado	0,00 h
2013B	4,87 c	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	18,90 g	5,24 c	clavado	0,00 h
2013C	5,74 b	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	19,49 f	4,73 e	clavado	0,00 h
2213A	4,13 e	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	22,68 c	3,69 i	arredondado	0,49 h
2213B	4,93 c	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	21,93 d	3,73 i	arredondado	0,49 h
2213C	4,65 d	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	23,46 a	4,13 g	arredondado	0,49 h
6213A	4,91 c	branco	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	18,65 h	3,57 i	clavado	0,00 h
6213B	4,57 d	branco	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	19,08 g	3,62 i	clavado	0,00 h
6213C	4,97 c	branco	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	18,03 i	3,51 i	clavado	0,00 h
6813A	6,09 a	cinza	branco	Cinza	presente	ausente	ausente	20,56 e	4,20g	clavado	0,92 g
6813B	5,86 b	cinza	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	17,71 i	4,10 g	clavado	0,00 h
6813C	6,12 a	cinza	branco	Cinza	ausente	ausente	ausente	19,16 g	4,02 g	clavado	0,00 h
8613A	5,45 b	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	23,15 b	3,86 h	arredondado	0,00 h
8613B	5,45 b	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	23,64 a	3,63 i	arredondado	0,00 h

Tabela 4.2 – Código e características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no presente estudo. Londrina, 2017.

Isolados	IVCM (cm)	Coloração					Esporos		Ápices	Severidade (%)	
		Colônia	Borda	Reverso	Peritécio	Acervulo	Massa conidial	Comprimento (µm)			Largura (µm)
8613C	5,60 b	cinza escuro	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	23,24 b	3,86 h	arredondado	0,00 h
8713A	4,02 e	cinza	branco	cinza escuro	ausente	presente	ausente	21,71 d	3,70 i	arredondado	0,00 h
8713B	4,37 d	cinza	branco	cinza escuro	ausente	presente	ausente	21,40 d	3,01 k	arredondado	0,00 h
8713C	5,95 a	cinza	branco	cinza escuro	ausente	presente	ausente	21,61 d	3,27 j	arredondado	0,00 h
8813A	5,50 b	cinza escuro	cinza claro	Preto	ausente	ausente	ausente	19,88f	3,53i	arredondado	0,00 h
8813B	5,47 b	cinza escuro	cinza claro	Preto	ausente	ausente	ausente	20,23 e	3,47 i	arredondado	0,00 h
8813C	4,46 d	cinza	cinza claro	cinza escuro	ausente	ausente	ausente	20,16 e	3,49 i	arredondado	0,00 h
8913A	5,15 c	cinza	cinza claro	Cinza	presente	ausente	ausente	17,74 i	4,72 e	arredondado	0,64 g
8913B	5,69 b	cinza	cinza claro	Cinza	presente	ausente	ausente	16,65 j	5,01 d	arredondado	0,59 g
8913C	5,66 b	cinza	cinza claro	Cinza	presente	ausente	ausente	17,04 j	5,02 d	arredondado	0,59 g
9513A	6,14 a	cinza	cinza claro	Cinza	presente	ausente	ausente	15,16 l	4,69e	arredondado	0,00 h
9513B	5,77 b	cinza	cinza claro	Cinza	presente	ausente	ausente	15,44 l	4,22 g	arredondado	0,00 h
9513C	5,19 c	cinza	cinza claro	Cinza	presente	ausente	ausente	15,39 l	4,06 g	arredondado	0,00 h
9713A	6,04 a	cinza	Branco	Cinza	presente	ausente	ausente	17,83 i	4,75e	arredondado	0,00 h
9713B	5,81 b	cinza	Branco	Cinza	presente	ausente	ausente	17,59 i	4,88 d	arredondado	0,00 h
9713C	5,51 c	cinza	Branco	Cinza	presente	ausente	ausente	17,40 i	4,85 d	arredondado	0,00 h

Tabela 4.2 – Código e características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no presente estudo. Londrina, 2017.

Isolados	IVCM (cm)	Coloração					Acervulo	Massa conidial	Comprimento (µm)	Esporos		Severidade (%)
		Colônia	Borda	Reverso	Peritécio	Largura (µm)				Ápices		
10013A	5,21 b	cinza	cinza claro	cinza escuro	presente	ausente	ausente	18,34 h	4,91d	arredondado	4,44 d	
10013B	5,61 b	cinza	cinza claro	cinza escuro	presente	ausente	ausente	18,40 h	4,97 d	arredondado	4,63 d	
10013C	5,57 b	branco	branco	cinza claro	presente	ausente	ausente	18,29 h	4,95 d	arredondado	4,88 d	
C.V.	14,32	-	-	-	-	-	-	12,14	24,86	-	75,31	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$) de probabilidade.

Fonte: o próprio autor

Tabela 4.3 – Código de identificação dos isolados de *Colletotrichum truncatum*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado	Protioconazol	Carbendazim	Sensibilidade	Piraclostrobina	Sensibilidade
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
287A	22/05/1992	Balsas, MA	2,9326	> 50	AR	< 0,0032	S
287B	22/05/1992	Balsas, MA	2,8299	> 50	AR	< 0,0032	S
287C	22/05/1992	Balsas, MA	1,8930	> 50	AR	< 0,0032	S
289A	28/08/2004	Boa Vista, RR	0,2926	> 50	AR	0,0003	S
289B	28/08/2004	Boa Vista, RR	1,1432	> 50	AR	< 0,0032	S
289C	28/08/2004	Boa Vista, RR	4,6777	> 50	AR	< 0,0032	S
938A	05/04/2011	Bela Vista do Paraíso, PR	1,2143	2,9326	MR	0,0001	S
938B	05/04/2011	Bela Vista do Paraíso, PR	1,7331	2,8299	MR	< 0,0032	S
938C	05/04/2011	Bela Vista do Paraíso, PR	1,4102	1,8930	MR	< 0,0032	S
1172A			0,0514	> 50	AR	0,3847	S
1172B			0,0561	> 50	AR	4,8144	MR
1172C			0,0593	> 50	AR	0,3220	S
1179A	20/02/2013	Bela Vista do Paraíso, PR	2,6917	> 50	AR	4,7764	MR
1179B	20/02/2013	Bela Vista do Paraíso, PR	1,6526	> 50	AR	4,8833	MR
1179C	20/02/2013	Bela Vista do Paraíso, PR	3,0248	> 50	AR	4,5937	MR
0313A	05/02/2013	Londrina, PR	0,0860	> 50	AR	5,3280	MR
0913A	05/02/2013	Londrina, PR	0,1030	> 50	AR	1,2193	MR
0913B	05/02/2013	Londrina, PR	0,1971	> 50	AR	0,8328	S
0913C	05/02/2013	Londrina, PR	0,0934	> 50	AR	0,3666	S
2213A	17/01/2013	Boa Esperança, PR	0,5430	> 50	AR	4,4964	MR
2213B	17/01/2013	Boa Esperança, PR	0,5454	> 50	AR	5,0977	MR
2213C	17/01/2013	Boa Esperança, PR	0,4243	> 50	AR	4,5233	MR
6813A	06/03/2013	Cruzmalina, PR	0,0334	> 50	AR	4,8407	MR
8913A	13/03/2013	Faxinal, PR	4,0583	> 50	AR	4,9294	MR
8913B	13/03/2013	Faxinal, PR	2,7056	> 50	AR	4,4099	MR

Tabela 4.3 – Código de identificação dos isolados de *Colletotrichum truncatum*, ano e local de isolamento, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para protioconazol, carbendazim e piraclostrobina. Londrina, 2017.

Isolado	Ano	Município, Estado	Protioconazol	Carbendazim	Piraclostrobina		
			CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade
8913C	13/03/2013	Faxinal, PR	2,5758	> 50	AR	4,5651	MR
10013A	12/03/2013	Ponta Grossa, PR	2,1450	> 50	AR	2,6873	MR
10013B	12/03/2013	Ponta Grossa, PR	0,5267	> 50	AR	2,1923	MR
10013C	12/03/2013	Ponta Grossa, PR	0,6960	> 50	AR	1,8842	MR

AR – Altamente resistente, $CE_{50} \geq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; MR - moderadamente resistente, $CE_{50} > 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; S - Sensível, $CE_{50} \leq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Fonte: o próprio autor

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve variação quanto às características morfológicas dos 87 isolados de *Colletotrichum* spp.

Para IVCM, os diâmetros médios das colônias variaram de 1,90 cm a 6,43 cm, sendo considerado IVCM lento os isolados com diâmetro de colônia até 4,9 cm; intermediário de 5,0 cm a 6,9 cm; e rápido de 7,0 a 9,0 cm. Dos 87 isolados de *Colletotrichum* spp. testados, 52% foram considerados com IVCM lento e 48% foram considerados IVCM intermediário, nenhum dos isolados testados foram considerados com IVCM rápido. Conforme apresentado na tabela 4.2, os isolados coletados no mesmo ano e município apresentaram variação no IVCM.

Os 87 isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram-se bastante heterogêneos quanto à coloração. Foram observadas coloração da colônia branca, cinza, cinza claro, cinza escuro e cinza no centro com cinza claro ao redor. Na avaliação da coloração da borda da colônia, foram encontrados coloração branca, cinza e cinza claro; e na avaliação da coloração do reverso da colônia, foram encontrados a coloração branco, cinza, cinza claro, cinza escuro e cinza no centro com cinza claro ao redor. Conforme apresentado na tabela 4.2, os isolados coletados no mesmo ano e município apresentaram coloração da colônia, borda e reverso semelhantes entre si. Trinta e três por cento dos isolados apresentaram peritécio, 4% apresentaram acérvulo, 10% apresentaram massa conidial de coloração laranja e 1% apresentou massa conidial de coloração salmão (Tabela 4.2).

Na morfologia de esporos, todos os isolados apresentaram esporos não septados e hialinos. O comprimento dos esporos variou de 10,75 μm a 24,16 μm , e a largura dos esporos variou de 2,49 μm a 6,36 μm . Conforme apresentado na tabela 4.2, os isolados coletados no mesmo ano e município apresentaram comprimento e largura dos esporos estatisticamente semelhantes entre si. Cinquenta e nove por cento dos isolados avaliados apresentaram esporos clavados, com tamanho variando de 15,14 - 24,16 μm de comprimento \times 2,49 - 5,22 μm de largura e 41% apresentaram esporos arredondados, variando de 10,75 - 23,64 μm de comprimento \times 3,01 - 6,36 μm de largura (Tabela 4.2). Com exceção dos isolados 938A, 938B e 938C, coletados na data 05/abr/2016, no município de Bela

Vista do Paraíso, Paraná, Brasil, os demais isolados coletados antes do ano de 2013 apresentaram esporos com formato clavado.

Dos 87 isolados avaliados, 29 foram patogênicos à soja, com diferenças na agressividade. A maior média de severidade para antracnose na soja foi de 7,31%, observada para o isolado 287C, seguido pelos isolados 287A com 6,75% de severidade e 287B com 6,44% de severidade da antracnose, coletados na data 22/mai/1992, no município de Balsas, Maranhão, Brasil, sendo estes isolados estatisticamente mais agressivos que os demais isolados testados (Tabela 4.2).

Na análise de agrupamento de dados observou-se que os isolados coletados nos mesmos ano e município, diferenciados pelas letras A, B e C, pertenceram sempre aos mesmo grupo, independente do algoritmo utilizado e das medidas de distância, indicando uma estratificação dos isolados quanto às suas origens geográficas e ano de coleta, por isso para fins de comparação um novo agrupamento foi gerado a partir das médias de A, B e C, o que resultou em um dendrograma contendo 29 isolados de *Colletotrichum* spp.

O dendrograma resultante do agrupamento dos dados quantitativos e qualitativos de cada isolado se apresenta na figura 4.1. Com a análise de agrupamentos, foi possível observar a formação de 15 grupos no experimento 1 e 16 grupos no experimento 2, ao se utilizar a distância de 0,4 como ponto de corte. Em ambos os experimentos observou-se que os isolados coletados no estado do Mato Grosso (isolado 286, coletado no ano de 1992 e isolado 6213, coletado no ano de 2013), Maranhão (isolado 287, coletado no ano de 1992) e Roraima (isolado 289, coletado no ano de 2004) não se enquadraram nos grupos que continham isolados do estado do Paraná. Também pode-se observar para ambos os experimentos que o isolado 290, coletado no estado do Paraná, no ano de 2005, não se enquadrou nos grupos que continham isolados do estado do Paraná, coletados em anos posteriores a 2010.

No experimento 1, dos 15 grupos formados no dendrograma, 11 grupos foram formados apenas por um isolado de *Colletotrichum* spp., enquanto que no experimento 2, dos 16 grupos formados, 13 grupos foram formados apenas por um isolado de *Colletotrichum* spp. (Figura 4.1).

Confrontando os dois dendrogramas gerados (Figura 4.1), experimento 1 e 2, pode-se observar que o grupo 7 do dendrograma do experimento 1 e o grupo 2 do experimento 2, são compostos pelos mesmos isolados, sendo que

estes são compostos por 9 isolados de *Colletotrichum* spp., coletados no estado do Paraná, com ano de coleta superior a 2012, com exceção do isolado 929, pertencente ao grupo em questão, coletado no estado do Paraná, mas que não se tem informação do ano de coleta. O grupo quatro do experimento 1 e o grupo 11 do experimento 2, são compostos pelos mesmos quatro isolados de *Colletotrichum* spp., todos coletados no estado do Paraná, no ano de 2013. O grupo 5 do experimento 1 e o grupo 8 do experimento 2, são compostos pelos isolados 1176 e 1177, acrescido do isolado 6813 no experimento 2, no entanto, os três isolados de *Colletotrichum* spp. foram coletados no estado do Paraná, no ano de 2013. O experimento 1, constou de mais um grupo no dendrograma, composto por mais de um isolado, sendo este o grupo 2, compostos por isolados de *Colletotrichum* spp. coletados no estado do Paraná em anos posteriores a 2010.

Os 29 isolados que apresentaram-se patogênicos a soja e foram utilizados no teste de sensibilidade a fungicidas. Com base nas diferenças de sensibilidade para os produtos carbendazim e piraclostrobina, os isolados testados foram divididos em três fenótipos da seguinte forma: altamente resistente (AR), $CE_{50} \geq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; moderadamente resistente (MR), $1 \mu\text{g mL}^{-1} < CE_{50} < 10 \mu\text{g mL}^{-1}$; e sensível, $CE_{50} \leq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o fungicida carbendazim, níveis de resistência moderado e alto foram observados para os 29 isolados de *C. truncatum*. Oitenta e nove por cento dos isolados testados não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu acima da maior dose avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). A CE_{50} estimada variou de $1,89 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $2,93 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 4.3). Dos isolados avaliados 89% foram considerados altamente resistentes e 10% foram considerados moderadamente resistentes a carbendazim. Nenhum dos isolados apresentou sensibilidade ao fungicida carbendazim e os isolados coletados em 1992 (MES 287A, 287B E 287C), antes das recomendações de fungicida no campo, foram classificados como altamente resistentes, pois 50% da inibição ocorreu acima da maior dose avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os isolados coletados no mesmo ano e município apresentaram níveis de resistência semelhante entre si.

Para o fungicida piraclostrobina, foram encontrados isolados com níveis de resistência moderado e sensível entre os 29 isolados de *C. truncatum*. Vinte e quatro isolados testados não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu abaixo da menor dose avaliada ($0,0032 \mu\text{g mL}^{-1}$). A CE_{50} calculada

para o fungicida piraclostrobina variou de $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $5,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 4.3). Os isolados coletados em 1992 (MES 289A, 289B e 289C), antes da primeira recomendação de fungicidas na soja, foram classificados como sensíveis ao fungicida piraclostrobina, no entanto, a CE_{50} para estes isolados não foram estimadas, pois 50% da inibição ocorreu abaixo da menor dose avaliada ($0,0032 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dos isolados avaliados 55% foram considerados moderadamente resistentes e 44% foram considerados sensíveis a piraclostrobina. Apesar de terem sido detectadas amostras moderadamente resistentes à piraclostrobina em 2013, isso não foi uma tendência geral desses isolados, uma vez que isolados sensíveis também foram detectados em 2013 (MES 0913B e 0913 C – Londrina, PR). De forma geral, os isolados coletados no mesmo ano e município apresentaram níveis de resistência e sensibilidade semelhantes entre si, com exceção do isolado, MES 1172B (origem desconhecida) e 0913A, que (Londrina, PR, coletado em 2013) que se apresentaram moderadamente resistente, enquanto os demais isolados do mesmo município e ano de coleta apresentaram-se sensíveis ao fungicida piraclostrobina.

Para o fungicida protioconazol não foram assumidos níveis de resistência uma vez que a resistência a fungicidas IDM ocorre de forma gradual, sendo descrita como mudanças de sensibilidade (BRENT, 2011). Protioconazol foi utilizado na cultura da soja pela primeira vez em 2010, e uma elevação nos valores de CE_{50} para populações de 2011 podem indicar uma tendência de mudança de sensibilidade do fungo. Embora a resistência cruzada possa ocorrer dentro do grupo e outros IDMs tenham sido intensamente utilizados na cultura da soja desde 2001, protioconazol possui fator de resistência muito menor que outros IDMs (BRENT; HOLLomon, 2007). Para protioconazol todos os isolados foram completamente inibidos a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. A CE_{50} calculada para o protioconazol variou de $0,051 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $4,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média de $1,39 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 4.3). A média dos valores de CE_{50} para protioconazol, para os isolados coletados antes de 2010, antes da primeira recomendação de protioconazol na cultura da soja, foi de $2,29 \mu\text{g mL}^{-1}$. Vinte e sete por cento dos isolados de *C. truncatum* apresentaram $CE_{50} > 2,29 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Houve variação na velocidade de crescimento dos 87 isolados de *Colletotrichum* testados. Pode ser observado que a maioria dos isolados de *Colletotrichum* coletados no ano de 2013, apresentaram IVCM intermediário (5,0 a 6,9 cm). Dias (2014), estudando a variabilidade morfo-molecular de *Colletotrichum*

truncatum associado à antracnose da soja na América do Sul, também encontrou variedade na velocidade de crescimento dos isolados testados, sendo que o diâmetro médio das colônias encontrados pela autora variaram de 3,7 × 3,8 cm a 9 × 9 cm, encontrando isolados de *C. truncatum* classificados com IVCM lento, intermediário e rápido.

Variação na velocidade de crescimento de outras espécies de *Colletotrichum*, também são descritas na literatura, como por exemplo, nos trabalhos conduzidos por Andrade et al., (2007), onde estudaram a caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro, encontraram variação na velocidade de crescimento dos 29 isolados testados.

Os 87 isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram-se heterogêneos quanto a coloração da colônia, bordas e reverso (variando de branco, cinza, cinza escuro, cinza claro e cinza no centro com cinza claro ao redor) e aspectos da colônia, como presença de peritécio, acérvulo e massa conidial. Yang e Hartman (2011) encontraram colorações de colônias de espécies de *Colletotrichum* spp. causando antracnose em soja, no estado de Illinois, semelhantes às encontradas no presente trabalho.

Dias (2014) também observou variação na coloração e aspectos das colônias de isolados de *C. truncatum*. Em relação a coloração micelial, o autor encontrou coloração branca com cinza a cinza-escuro na parte superior da colônia e de cores negra a rosa-alaranjado no reverso. As cores encontradas para o reverso da colônia no presente trabalho se diferem das encontradas pela respectiva autora. Dias (2014) descreve também que alguns isolados apresentaram peritécio e massa conidial de coloração variando de bege a laranja. No presente trabalho, também foram observados alguns isolados de *Colletotrichum* spp. contendo peritécios e massa conidial, no entanto, no presente trabalho a coloração da massa conidial foi salmão e laranja.

De acordo com as características morfométricas descritas por Sutton (1980), o tamanho dos esporos de *C. truncatum* variam de 19,00 – 26,50 µm para comprimento e de 3,5 - 4,5 µm para largura. No presente trabalho o tamanho dos esporos dos 87 isolados de *Colletotrichum* spp. variaram de 10,75 - 24,16 µm para comprimento e 2,49 - 6,36 µm para largura, embora os limites para o tamanho dos esporos encontrados no presente trabalho sejam distintos dos descritos por

Sutton, a maioria dos isolados de *Colletotrichum* spp., testados no presente estudo, apresentaram tamanho de esporos dentro da faixa descrita pelo respectivo autor.

Outros autores descrevem o comprimento de esporos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Dias (2014) encontrou isolados de *C. truncatum* com tamanho variando de 19 – 29 μm de comprimento, e 3 – 4 μm de largura. Yang e Hartman encontraram, para os 25 isolados de espécies de *Colletotrichum* causando antracnose em soja, esporos medindo de 14,16 – 32,52 μm de comprimento e 1,85 – 5,51 μm de largura. Jagtap e Sontakke (2009) estudaram a morfologia de *C. truncatum* patogênicos a soja na Índia e observaram conídios variando de 18,8 \times 3,5 μm a 26,4 \times 3,6 μm em seis isolados. Carvalho (2009) caracterizou *C. truncatum* causadores da antracnose do feijão fava e encontrou as mesmas variações descritas pelos demais autores, esporos com tamanhos variando de 18,3 - 26,6 μm \times 2,0 - 4,0 μm .

Dos 87 isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados, 59% apresentaram esporos com ápices clavados e 41% arredondados. Yang e Hartman (2011) também encontraram esporos com ápices clavados e arredondados, para os isolados de espécies do gênero *Colletotrichum* causador de antracnose na soja. Os presentes autores descrevem para os isolados com esporos clavados, tamanhos que variaram de 16,43 – 25,96 μm para comprimento e 1,85 – 4,23 μm para largura e para os esporos arredondados, tamanhos variando de 14,16 – 32,52 μm para comprimento e 2,65 – 5,51 μm para largura. Os dados apresentados por Yang e Hartman (2011) se aproximam dos obtidos no presente trabalho, tanto para os esporos com ápices clavados (15,14 - 24,16 μm de comprimento \times 2,49 – 5,22 μm de largura), quanto para os esporos com ápices arredondados (10,75 – 23,64 μm de comprimento \times 3,01 – 6,36 μm de largura). Yang e Hartman (2011) classificaram os isolados com esporos clavados como sendo *C. truncatum* e os isolados contendo esporos com ápices arredondados como sendo a forma teleomórfica do fungo *G. glycines*.

Nas avaliações de severidade da antracnose na soja, foram observadas diferenças na agressividade entre os isolados testados, sendo que 33,4% dos isolados testados no presente estudo, causaram sintomas de antracnose em soja. Yang e Hartman (2011) também encontraram isolados de *C. truncatum*, com diferentes capacidades para causar sintomas de antracnose em plantas de soja, os autores concluíram que, os isolados que apresentaram esporos com ápice

clavado, causaram sintomas de antracnose mais severos nas folhas destacadas da soja. No presente estudo, não foi possível classificar os isolados patogênicos à soja apenas pelo formato do ápice dos esporos.

Em ensaios de patogenicidade e agressividade de *C. truncatum* em plântulas de soja, Dias (2014) também encontrou diferenças na agressividade dos isolados. A autora avaliou incidência da antracnose em cotilédones e caule de plântulas de soja e encontrou diferença na agressividade dos isolados.

Sessenta e seis por cento dos isolados testados, não causaram sintomas de antracnose nas folhas destacadas de soja, confirmando a hipótese de que espécies não patogênicas do gênero *Colletotrichum* são frequentemente isoladas de tecidos necrosados e erroneamente atribuídas como agentes causais da necrose.

Na análise do dendrograma resultado do agrupamento de dados, não foi possível observar uma tendência de agrupamento dos isolados de *Colletotrichum* spp. patogênicos em um grupo distinto, sendo que tanto os grupos representados por um único isolado, quanto os grupos compostos por mais de um isolado, continham representantes patogênicos e não patogênicos a soja, não sendo possível fazer uma diferenciação dos isolados de *Colletotrichum* spp., como patogênico ou não patogênico a soja, levando em consideração apenas os seus atributos qualitativos e quantitativos. Acredita-se que para diferenciar os isolados como patogênicos e não patogênicos a soja, seja necessário análises mais específicas, como por exemplo, análise molecular. Andrade et al., (2007), estudando a caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro, também observou que os isolados associados ao mamoeiro apresentaram grande variabilidade nas características morfoculturais e também em agressividade quando inoculados nos frutos, os autores concluíram que dentro dos caracteres avaliados no estudo, a análise molecular de ITS-RFLP com *RsaI* mostrou-se a mais adequada para identificação e caracterização dos isolados do mamoeiro.

Dias (2014) em estudo com 54 isolados de *C. truncatum*, também observou estratificação dos isolados quanto às suas origens geográficas, no entanto, a autora utilizou para separação de grupos a técnica RAPD, enquanto no presente estudo, foi utilizado apenas as características morfológicas e patogenicidade na análise de componentes principais para a distribuição de isolados em grupos com

similaridades. Barros (2008), também utilizou a técnica RAPD e concluiu que os isolados de *C. truncatum* foram separados em três grupos distintos, predominando uma distribuição conforme a localidade.

Apenas os isolados *C. truncatum* que se apresentaram patogênicos a soja, foram utilizados no teste de monitoramento de sensibilidade a fungicidas IDM, MBC e IQo, e foi observado diferença na sensibilidade do fungo aos fungicidas testados.

Menor sensibilidade do fungo *C. truncatum*, isolado de plantas de soja, a MBCs tem sido relatada nos últimos anos no Brasil em diferentes regiões produtoras (SARTORI, 2007; DIAS, 2014; SOUZA, 2009). Em lavouras ou regiões com histórico da antracnose da soja, os fungicidas MBCs, principalmente o carbendazim, tem sido indicado e utilizado para o controle da doença (SOUZA, 2009). No entanto, apesar da baixa eficiência, os MBCs representaram 6% das recomendações para o controle das enfermidades na soja em 2012 no Brasil, correspondendo a 10,6 mil toneladas do volume de fungicidas comercializados (KLEFFMANN, 2012).

Souza (2009) estudando a sensibilidade de isolados de *C. truncatum* a fungicida, observou que o carbendazim foi o menos eficiente, com valores de CE_{50} igual $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses dados corroboram com os dados apresentados no presente trabalho, onde 89% dos isolados foram considerados altamente resistentes ($CE_{50} \geq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 10% foram considerados moderadamente resistentes ($1 \mu\text{g mL}^{-1} < CE_{50} < 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) a carbendazim. No presente estudo a CE_{50} variou de $1,89 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $2,93 \mu\text{g mL}^{-1}$, no entanto 89% dos isolados testados não tiveram a CE_{50} estimada porque 50% de inibição ocorreu acima da maior dose avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Trabalhos com outras espécies do gênero *Colletotrichum* também observaram menor sensibilidade do fungo aos fungicidas MBCs. Sartori (2007) estudando a sensibilidade, *in vitro*, de 20 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* do feijão, proveniente de diferentes regiões do país, também verificou a existência de isolados com baixa sensibilidade a carbendazim e ao tiofanato metílico, ambos pertencentes ao grupo MBCs. Maringoni e Barros (2002), avaliando a sensibilidade, *in vitro*, de cinco isolados de *C. lindemuthianum* aos fungicidas benomyl, carbendazin, tiofanato metílico, observou que todos os isolados apresentaram baixa

sensibilidade aos três fungicidas do grupo MBCs, indicando a ocorrência de resistência cruzada a estes produtos.

Provavelmente a baixa sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* spp. para os fungicidas do grupo MBCs sejam devida à resistência dos isolados. A resistência de fungos a fungicidas MBCs ocorre devida à mutação do gene da β tubulina, causando alterações nas seqüências de bases e, conseqüentemente, na síntese de aminoácidos, principalmente nos codons 198 ou 200 (MCKAY; COOK, 1997; MCKAY et al., 1998). No Brasil, há relatos da existência de vários fungos fitopatogênicos resistentes a fungicidas do grupo dos MBCs, como por exemplo, *Cercosporidium personatum* (MARINGONI; BARROS, 2002), *Botrytis cinerea* (CABRINI; KIMATI, 1986; GHINI; KRUGNER, 1987), *B. squamosa* (GHINI; KIMATI, 1989), *Guinardia citricarpa* (MARTINS; OLIVEIRA; DUARTE, 1998) e *Corynespora cassicola* (XAVIER et al., 2013).

Balardin e Rodrigues (1994) com o objetivo de verificar o efeito de diferentes fungicidas no crescimento micelial, *in vitro*, de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*, testou os fungicidas tiofanato metílico + clorotalonil, clorotalonil, trifenil hidróxido de estanho, tiofanato metílico e benomyl em diferentes concentrações e observou variação significativa no crescimento micelial devido à ação dos fungicidas nas diferentes concentrações estudadas. Os autores observaram que a maior inibição foi observada pelos produtos com ação sistêmica, o que pode implicar em maior pressão de seleção e acarretar o surgimento de isolados adaptados.

Com relação a sensibilidade de isolados de *C. truncatum* a fungicidas dos grupos IQo e IDM, Souza (2009) encontrou CE_{50} variando de 1,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a mistura epoxiconazol + piraclostrobina; 2,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a mistura ciproconazol + trifloxistrobina; 4,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para tebuconazol; 9,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a mistura ciproconazol + azoxistrobina. O autor concluiu que as misturas de IDM + IQo mostraram potencial para o controle da antracnose em soja. No presente trabalho a média da CE_{50} para fungicida IDM foi menor do que a encontrada por Souza (2009) (a CE_{50} calculada para o protioconazol variou de 0,051 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 4,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, média de 1,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Essa diferença pode ser explicada devido ao ingrediente ativo usado que foi diferente nos dois trabalhos, no trabalho de Souza (2009) foi utilizado o fungicida tebuconazol, do grupo dos triazóis, e no presente trabalho, foi utilizado o fungicida protioconazol, do grupo dos triazolinthione, ambos são

inibidores da biossíntese de ergosterol, importante componente da membrana celular dos fungos sensíveis, tendo como sítio primário de atuação a desmetilação do C-14, razão pela qual são classificados como fungicidas DMI (GODOY et al., 2013).

O autor, Souza (2009), não calculou a CE_{50} para fungicida IQo utilizado isoladamente, fora das misturas.

Silva (2013), estudando a sensibilidade *in vitro* de *C. truncatum* a fungicidas, observou eficiência de controle do fungicida piraclostrobina. No presente estudo, também foram encontrados isolados da espécie *C. truncatum* sensíveis ao fungicida pertencente ao grupo IQo (piraclostrobina), sendo que 44% foram considerados sensíveis ($CE_{50} \leq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 55% foram considerados moderadamente resistentes ($1 \mu\text{g mL}^{-1} < CE_{50} < 10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Silva (2013), estudando a sensibilidade *in vitro* de *C. truncatum* a fungicidas, também observou eficiência de controle do fungo com o fungicida piraclostrobina.

Sensibilidade de *Colletotrichum* spp. a fungicidas IQo e IDM também foram estudados em outros patossistemas, Sartori (2007) estudando a espécie *C. lindemuthianum* isolado do feijão, observou que, 15% dos isolados de *C. lindemuthianum* estudados tiveram crescimento micelial inibido pelo fungicida trifloxistrobina, do grupo dos IQo, na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 55% dos isolados tiveram o crescimento micelial inibido na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para os fungicidas IDM, Sartori (2007) observou que 50% foram inibidos na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 49% foram inibidos na concentração entre 1 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Kososki et al., (2001) estudando o patossistema *C. acutatum* em morango, verificaram que tebuconazol foi um dos fungicidas mais eficazes em testes de fungitoxicidade *in vitro*.

Melhor eficiência de fungicidas IDM e IQo para o controle do *C. truncatum*, também foram observados em estudos conduzidos a campo. Dias (2011a) estudando o controle químico da antracnose da soja, concluiu que os melhores tratamentos fungicidas foram aqueles combinando princípios ativos IDM + IQo, tanto na redução da incidência da doença quanto no aumento da produtividade. No entanto, Souza (2009), em ensaios conduzidos em Passo Fundo, RS, nas safras 2005/2006 e 2006/2007, mostram controle da antracnose em soja, inferior a 50%, o que ela atribuiu em parte à reduzida ação curativa dos fungicidas (carbendazim,

tebuconazole, ciproconazol + azoxistrobina, ciproconazol + trifloxistrobina, epoxiconazol + piraclostrobina). Outra causa de baixa eficiência pode estar associada à baixa sensibilidade do patógeno aos princípios ativos testados, ou da variabilidade das populações de *Colletotrichum* spp. associadas à antracnose da soja, que pode envolver mais de uma espécie (HARTMAN et al., 1999).

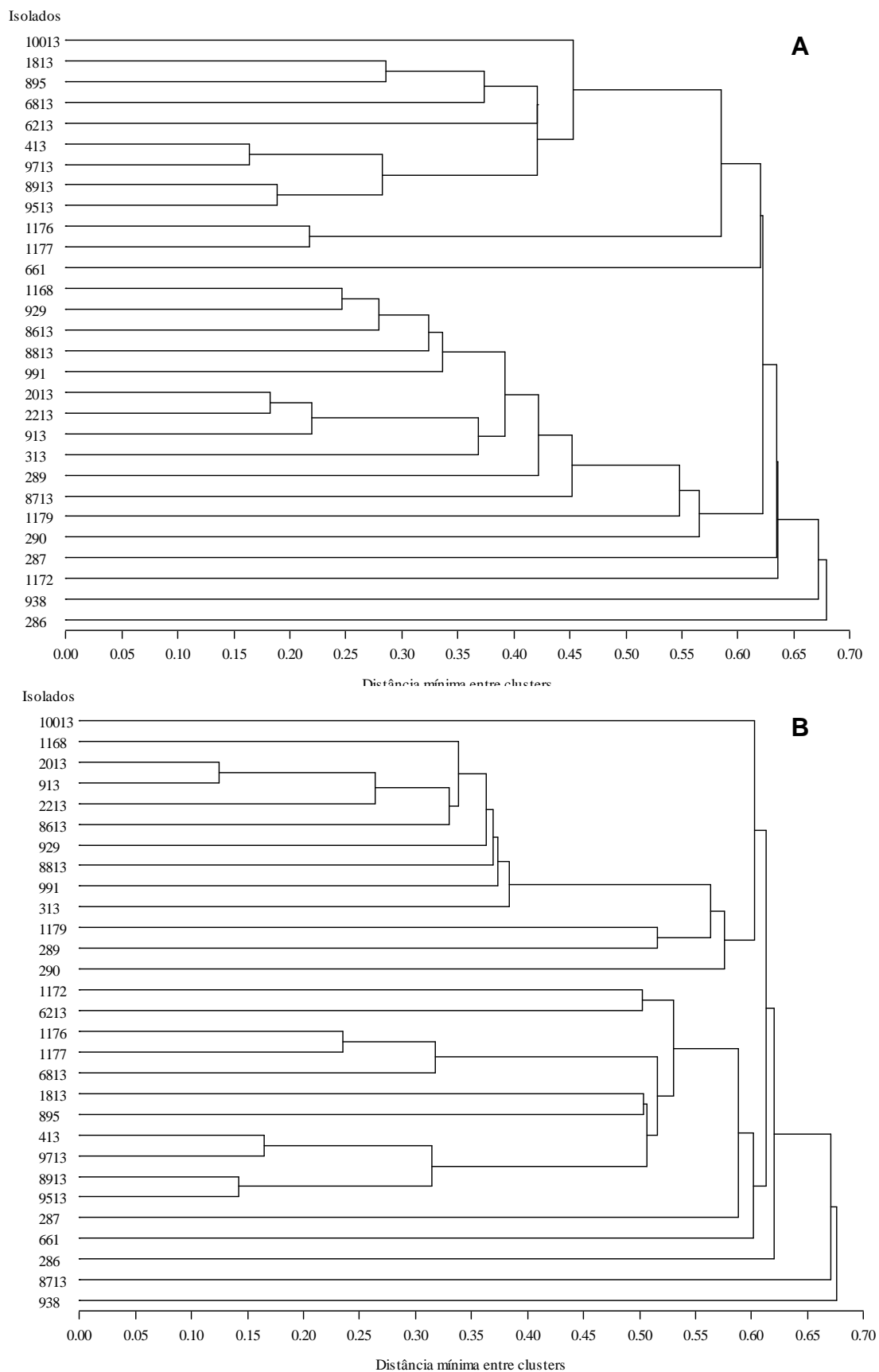


Figura 4.1 – Dendrograma resultado do agrupamento de dados pelo método SINGLE, considerando os atributos quantitativos e qualitativos, para os isolados de *Colletotrichum* spp. (A – experimento 1 e B – experimento 2). Londrina, 2017.

4.6 CONCLUSÃO

Com base nas características morfológicas e na descrição contida na literatura (SUTTON, 1980), os 87 isolados de *Colletotrichum* spp. testados no presente estudo, foram classificados como pertencentes a espécie *C. truncatum* ou a fase teleomórfica *G. glycines*.

Os isolados de *C. truncatum* apresentaram ampla variabilidade, não sendo possível uma diferenciação dos isolados de *Colletotrichum* spp., como patogênico ou não patogênico a soja, levando em consideração apenas os seus atributos qualitativos e quantitativos avaliados.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a menor eficiência de controle da antracnose na soja pode estar associada à presença de isolados do fungo resistentes aos fungicidas MBC e IQo. O fungicida carbendazim apresentou a menor eficiência de controle da antracnose entre os fungicidas avaliados.

5 CONCLUSÕES GERAIS

O método de microtitulação colorimétrica foi adequada para determinar a sensibilidade de *C. cassicola* aos fungicidas carbendazim e prothioconazole.

Os 87 isolados de *Colletotrichum* spp. testados no presente estudo, foram classificados como pertencentes a espécie *G. glycines* ou a fase anamórfica *C. truncatum*, não sendo possível uma diferenciação dos isolados de *Colletotrichum* spp., como patogênico ou não patogênico a soja, levando em consideração apenas os seus atributos qualitativos e quantitativos avaliados.

Os resultados de sensibilidade obtidos no presente trabalho sugerem que a menor eficiência de controle da mancha-alvo e da antracnose na soja pode estar associada à presença de isolados do fungo resistentes aos fungicidas MBC e IQo. O fungicida carbendazim apresentou a menor eficiência de controle da antracnose entre os fungicidas avaliados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUL-HAYJA, Z.; WILLIAMS, P. H. Disease handbook – **Target leaf spot (*Corynespora cassiicola*)** 2011. Disponível em:

<<http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/cuke/dshndbk/tls.html>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível

em:<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons/>. Acesso em: 27 mar. 2015.

ALMEIDA, A. M. R.; MACHADO, C. C.; FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ANTONIO, H. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, 1976. p. 111-112.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 569-588.

AVALHAES, T. A.; MACHADO, A. Q.; CASSETARI, D.; MELLO, A. C. T.; MOURA, T. A.; PINHO, R. A. Controle químico de mancha-alvo em soja em Mato Grosso. **Tropical Plant Pathology**, Cuiabá, v. 35, p. 115, 2010. Suplemento.

ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 021-031, 2007.

AVOZANI, A. **Sensibilidade de *Corynespora cassiicola*, isolados da soja, a fungicidas *in vitro***. 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária programa de Pós-graduação em Agronomia. Passo Fundo, 2011.

AZEVEDO, J. L. **A pesquisa agropecuária no Brasil**. Série Ciência e Tecnologia no Brasil, Escola de Administração de Empresas de São Paulo/FVG, 1993. p. 63.

BAILEY, J.A., JEGER, M. J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford, UK: CAB International. 1992.

BALARDIN, R. S.; BALARDIN, C. R. R. Eficiência de fungicidas para o controle de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijoeiro comum. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 19-23, 1994.

BARCELOS, R. A.; MACHADO, A. Q.; CASSETARI, D.; AVALHAES, T. A.; MOURA, T. A.; MATTIOLI, W. O. Eficiência do controle químico de mancha-alvo em soja em Mato Grosso. **Tropical Plant Pathology**, Cuiabá, v. 35, p. 111, 2010. Suplemento.

BARROS, G. E. G. Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* e Estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica

molecular RAPD. 2008. **Dissertação de mestrado**, Fesurv – Universidade de Rio Verde, GO, 2008.

BEDENDO, I. P. Manchas Foliaves. In: MONTEIRO, R. M.; FILHO, A. B.; LEITE, B.; FORCELINI, C. A.; SALGADO, C. L.; REIS, E. M.; KIMATI, H.; BEDENDO, I. P.; FERREIRA, L. P.; AMORIM, L.; BACCHI, L. M. A.; FERRAZ, L. C. C. B.; GALLO, L. A.; CAMARGO, E. A. C.; LAMBAIS, M. R.; CROCOMO, O. J.; GHINI, R.; PASCHOLATI, S. F.; KRUGNER, T. L.; BETTIOL, W. **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 848-855.

BLUM, M. M. C. **Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo-RS, 2009.

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

BRENT, K. J.; HOLLOWAY, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. Brussels: GCPF, 1998. p. 48. (FRAC Monograph, n.2).

BRENT, K. J.; HOLLOWAY, D. W. Fungicide Resistance: The assessment of Risk, **Frac Monograph**, n. 2, Croplife International, Brussels, 2007. p. 53

BRENT, K. J. **Resistência a fungicidas em patógeno de plantas cultivadas: como manejá-la?** (FRAC Monograph n. 1), 1999.

BRENT, K. J. Historical perspective of fungicide resistance. In: THIND, S.T. **Fungicide Resistance in Crop Protection**. Punjab Agricultural University, India, 2011. p. 3-18.

BRENT, K. J. Historical perspectives of fungicide resistance. In: THIND, T.S. **Fungicide resistance in crop protection, risk and management**, 2012. p. 3-18.

BRETON, F.; SANIER, C.; D'AUZAC, J. Role of cassicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. **J. Rubber Res.**, v. 3, n. 2, p. 115-128, 2000.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to Soybean Rust and Mode of Inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254 – 255, 1980.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A.; VANDERLEYDEN, J. Na automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiol Lett**, v. 69, p. 55-60, 1990.

CABI (2005). **Crop Protection Compendium**. *Colletotrichum truncatum*. Disponível em: <http://www.cabicompendium.org/cpc/datasheet.asp>. Acesso em: 20 mar. 2015.

CABRINI, H. M.; KIMATI, H. Ocorrência de isolados de *Botrytis cinerea* Pers ex Fr. resistentes a benomyl em morangos (*Fragaria* spp) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p.16, 1986.

CALEGARI, P.; GERALDES, J.; KEMPER, K.; PEREIRA, R.; SANTOS, C.; SINGER, P. Resultados do monitoramento de resistência de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas em soja. In: GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M. (Orgs.). **Reunião do Consórcio Antiferrugem Safra 2008-09**, Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 55-57.

CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em Feijão-fava: Caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. 2009. Tese (Doutorado em agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, 2009.

CASTILHO, L. B.; REIS, A.; HENZ, G. P. **Identificação morfológica de isolados de *Colletotrichum spp*, causadores de antracnose em solanáceas**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 2007. p. 29.

CAMPOS, H. D. O.; SILVA, L. H. C. P.; SILVA, J. R. C. Soja: Antracnose. **Cultivar Grandes Culturas**, v. 83, n. 7, p. 26-28, 2006.

CARLIN, V. J.; KONAGESKI, T. F. Avaliação de fungicidas no controle da mancha-alvo da soja na safra 2010/11 em Diamantino, MT. In: OLIVEIRA-JUNIOR, A.; SARAIVA, O. F.; LEITE, R. M. V. B. C. **XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil - Resumos Expandidos**, São Pedro, SP, 2011. p. 123-125.

CARREGAL, L. H.; CAMPOS, H. D.; SILVA, J. C. Fortalecida e agressiva. **Revista cultivar**, n. 14, p. 20-22, 2008.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safras-grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>> Acesso em: 17 mar. 2015.

COOLS, H. J.; FRAAIJE, B. A. Resistance to azole fungicides in *Mycosphaerella graminicola*: mechanisms and management. In: THIND, T.S. **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. London: UK, cap. 5, 2012. p. 64-77.

COSTA, I. F. D. **Controle de Doenças de Final de Ciclo na Cultura da Soja**. 2005. 100 fls. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2005.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 45-87, 2009.

DATE, H.; KATAOKA, E.; TANINA, K.; SASAKI, S.; INOUE, K.; NASU, H.; KASUYAMA, S. Sensitivity of *Corynespora cassicola*, causal agent of Corynespora target spot of tomato (*Lycopersicon esculentum*), to thiophanate-methyl and diethofencarb. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 70, p. 7-9, 2004.

DELP, C. J. Resistance to plant disease control agents: How to cope with it. In: KOMMENDAHL, T. (ed.). **Proceedings...IX International Congress of Plant Protection**, Burgess, Minneapolis, MN, v. 1, p. 253-261, 1979.

DEKKER, J. How to detect and measure fungicide resistance. **Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology**, 1987.

DIAS, M. D.; MIRANDA-FILHO, R. J.; CAFÉ-FILHO, A. C.; PINHEIRO, V. F. Controle químico da antracnose na cultura da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 429, 2011a. (Resumo).

DIAS, M. D.; MIRANDA FILHO, R. J.; CAFÉ FILHO, A. C.; PINHEIRO, V. F. Avaliação da incidência da antracnose em soja (*Colletotrichum truncatum*), na região Centro Oeste do Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 673, 2011b. (Resumo).

DIAS, M. D. **Etiologia, diversidade do agente causal e controle químico da antracnose da soja**. 2014. 146 fls. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Brasília, Brasília. 2014.

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

ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute/ CAB, 1971. 608 p.

EMBRAPA. **Tecnologia de Produção de Soja** - Região Central do Brasil 2009 e 2010. Londrina, PR, 2008. p. 261.

FARR, D. P.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. **Fungal databases. Systematic Botany and Mycology Laboratory**, ARS, USDA, 2007. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 21 mar. 2015.

FRAC - Fungicide Resistance Action Committee, **FRAC methods for monitoring fungicide resistance**, EPPO Bull, v. 21, p. 291-354, 1991.

FRAC (2007) **Comitê de Ação a Resistência a Fungicida**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/resist_fung.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2015.

FRAC (2013): **List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents**. Disponível em: http://www.frac.info/publication/anhang/List-of-resistant-plantpathogens_2013.pdf>. Acessado em 24 de mar de 2015.

FRAC (2014) Culturas: soja. Disponível em: <<http://frac-brasil.org.br/frac/>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

FRAC (2015) - **Comitê de Ação a Resistência a Fungicida**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/resist_fung.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2015.

FERNANDEZ-ORTUNO, D.; TORES, J. A.; DE VICENTE, A.; PEREZ-GARCIA, A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 11, p. 1-9, 2008.

FONTES, R. C. **Eficácia de fungicidas sistêmicos no controle de doenças de final de ciclo na cultura da soja**. 2000. 46 fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2000.

GEORGOPOULOS, S. G.; DOVAS, C. Occurrence of *Cercospora beticola* strains resistant to benzimidazole fungicides in northern Greece. **Plant Disease**, v. 57, p. 321-324, 1973.

GEORGOPOULOS, S. G. Detection and measurement of fungicide resistance. **Crop protection**, p. 24-31, 1982.

GHINI, R.; KRUGNER, T. L. Ocorrência de *Botrytis cinerea* resistente a benomyl em viveiros de *Eucalyptus viminalis*, em Três Barras, SC. **Summa Phytopathologica**, v. 13, n. 1/2, p. 37, 1987.

GHINI, R.; KIAMATI, H. Ocorrência de linhagens de *Botrytis squamosa* resistentes a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas. **Summa Phytopathologica**, v. 15, p. 246-256, 1989.

GHINI, R.; KIAMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GISI, U.; CHIN, K. M.; KNAPOVA, G.; KÜNG FÄRBER, R.; MOHR, U.; PARISI, S.; SIEROTZKI, H.; STEINFELD, U. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamides, DMI and strobilurin fungicides. **Crop Protection**. v. 38, p.1328-1349, 2000.

GIANASI, L. et al. Eficiência do fungicida captan associado a outros fungicidas no tratamento químico de sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.26, n.2, p.241-245, 2000.

GISI, U., SIEROTZKI, H. Fungicidas triazóis e estrobilurinas na cultura da soja: eficácia e risco de resistência. **Boletim de pesquisa de soja**, 2009. Fundação MT, 2009. p. 223-227.

GODOY, C. V.; CARNEIRO, C. M. T. P. G; IMAUTI, M. T.; PRIA, M. D.; AMORIM, L.; BERGER, R. D.; BERGAMIN FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Alemanha, v. 104, n. 4, p. 336-345, 1997.

GODOY, C. V. Risk and management of fungicide resistance in the Asian soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. In: THIND, T.S. (Org.). **Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and management**. London, UK: CABI, 2011. p. 87-95.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; ROESE A. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D. S. BORGES, E. P.;

SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; GRIGOLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; ITO, M. F.; MARTINS M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; BARROS, V. L. N. P.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2012/13: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Embrapa Soja. 2013. Circular Técnica 99.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C.M.; MEYER, M.C. et al. **Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Circular Técnica 100. Embrapa Soja, Londrina, 2013. p. 6.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D. S. BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; ARAUJO JUNIOR, I. P.; GRIGOLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; MADALOSSO, M.; VOLF, M. R.; BALARDIN, R. S.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2013/14: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Embrapa Soja. 2014. Circular Técnica 104.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, v. 3, p. 4-10, 1997.

GOULART, A. C. P. Eficiência do fungicida carbendazin (Bendazol SC) e sua mistura ao fungicida captan (Captan SC), aplicados em tratamento de sementes de soja, para o controle de patógenos. In: **Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**, 1998, Londrina, PR. Ata e resumos... Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. p. 254-255.

GOULART, A. C. P. Incidência e controle químico de fungos em sementes de soja em alguns municípios de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1457-1466, 2001.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. New York, John Wiley, 1993. 458 p.

HAMAWAKI, O. T.; JULIATTI, F. C.; GOMES, G. M.; RODRIGUES, F. A.; SANTOS, V. L. M. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de genótipos de soja do ciclo precoce/médio em Uberlândia, Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 201-205, 2002.

HARTMAN, G. L.; MANANDHAR, J. B.; SINCLAIR, J. B. Incidence of *Colletotrichum spp.* on soybean and weeds in Illinois and pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 70, p. 780-782, 1986.

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. **Compendium of soybean diseases**. 4. ed., St. Paul: American Phytopathological Society Press, 1999.

HASAMA, W. Occurrence and characteristics of resistant strains of *Corynespora melonis* against benzimidazole compounds. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 57, p.312-318, 1991.

HEPPERLY, P. R.; MIGNUCCI, J. C.; SINCLAIR, J. B.; MENDONZA, J. B. Soybean anthracnose and its seed assay in Puerto Rico. **Seed Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 371-380, 1983.

HOLLOMON, D. W.; BUTTERS, J. A.; KENDALL, S. J. **Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals**. Springer, Berlin, 1997. p. 1-20.

HOLOMON, D.W. (2012) **Resistência a fungicidas, definições e conceitos**. Disponível em: <http://www.frac-brasil.org.br/frac/secao.asp?l=10&c=52>. Acesso em: 20 mar. 2014.

ISHII, H. Resistance in *Venturia nashicola* to benzimidazoles and sterol demethylation inhibitors. In: THIND, T. S. **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. Wallingford UK. CAB International, 2012. p. 21-31.

JAGTAP, G. P.; SONTAKKE, P. L. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum truncatum* isolates pathogenic to soybean. **African Journal of Agricultural Research** 4, p. 1483-1487, 2009.

KAUSHAL, R. P.; ANIL, K.; TYAGI, P. D. Role of light, temperature and relative humidity on germination of *Colletotrichum truncatum* and soybean pod infection under laboratory conditions. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1998.

KLEFFMANN GROUP, **Crop Protection Products - Foliar Fungicides - AMIS Soybean 11/12**, 2012.

KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T. Infecção latent de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 158-164, 2001.

KOGA, L. J.; LOPES, I. O. N.; GODOY, C. V. Sensitivity monitoring of *Phakopsora pachyrhizi* populations to triazoles in Brazil. In: DEHNE, H. W.; DEISING, H. B.; GISI, U.; KUCH, K. H.; RUSSEL, P. E.; LYR, H. (Org.). **Modern fungicides and antifungal compounds VI**, Braunschweig: Lebenshilfeg GmbH, 2011. p. 211-216.

KOENNING, S. R.; CRESWELL, T. C. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in southeastern United States. **Plant Disease**, v. 90, p. 974, 2006.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia – princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, cap. 4, v. 1, 1995. p. 46-95.

KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das Cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.;

- CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia** - Doenças das Plantas Cultivadas. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, 2005. p. 293-302.
- LOOMIS, T. A. **Fundamentos de toxicologia**. 3. Ed. Zaragoza:Acribia, 1995.
- LUDWIG, A.; BOLLER, T. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. **FEMS Microbiol Lett**, v. 69, p. 61-66, 1990.
- MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L. Antracnose. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean disease**. 4rd American Phytopathological Society, 1999. p. 13-14.
- MARINGONI, A. C.; BARROS, E. M. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 2, p. 197-200, 2002.
- MARTINS, F. T.; OLIVEIRA, A. M. R.; DUARTE, V. Resistência de *Guinardia citricarpa* ao fungicida benomyl. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 256, 1998.
- MCKAY, G. J.; COOK, L. R. A PCR – based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p. 371-378, 1997.
- MCKAY, G. J.; EGAN, D.; MORRIS, E.; BROWN, A. E. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotrium dendroides* using PCR based method. **Mycological Research**, v. 102, n.6, p. 671-676, 1998.
- MCGRATH, M. T. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experience and challenges. **Plant Disease**, v. 85, p. 236-245, 2001.
- MELLO, M. M. **Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassicola* em soja**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo – RS, 2009.
- MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 307-320, 2002.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; GIANLUPPI, V.; MEYER, M. C. **Avaliação de Genótipos de Soja em Relação à Antracnose (*Colletotrichum truncatum*) e Mela (*Tanatephorus cucumeris*) nas Condições de Roraima**, 2004. 16 p.
- NOJOSA, G. B.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. Uso de fosfitose silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DIPIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE M. L.V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. FEALQ, Piracicaba, SP, 2005. 263 p.
- PERNEZNY, K.; SIMONE, G. W. **Target spot of several vegetable crops**. 1993. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FILES/VH/VH05200.pdf>> Acesso em: 17 mar. 2015.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. **Doenças de soja. Diagnose, epidemiologia e controle.** Passo Fundo: Embrapa CNPT, 1998. 91 p.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia.** 3. Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OLIVE, L. S.; BAIN, D. C.; LEFEBVRE, C. L. A leaf spot of cowpea and soybean caused by undescribed species of *Helminthosporium*. **Phytopathology**, v. 35, p. 822-831, 1945.

PERNEZNY, K.; SIMONE, G. W. **Target spot of several vegetable crops.** 1993. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/VH/VH05200.pdf>> Acesso em: 17 mar. 2015.

PHILLIPS, V. D. **Fungal Leaf Spots.** IN: COLYER, P.D. Soybean disease atlas. 2. ed. Louisiana: Louisiana State University, 1989.

RAMPERSAD, S. N. A rapid colorimetric microtiter bioassay to evaluate fungicide sensitivity among *Verticillium dahliae* isolates. **Plant Disease**, v. 95, p. 248-255, 2011.

RAPOSO R, COLGAN R, DELCAN J, MELGAREJO P, Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 97, p.294-296, 2015.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A. E.; REIS, A. C. **Manual de fungicidas:** guia para o controle de doenças de plantas. 5. ed. Passo Fundo. Universidade de Passo Fundo - RS, 2007. 153 p.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas –** Guia para o controle químico de doenças de plantas. 6. ed. Passo Fundo: Editora UPF, 2010. 226 p.

RIZZA, R. F. **Avaliação de fungicidas sistêmicos para o controle de doenças de final de ciclo na cultura da soja.** 1999. 39 fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.

RUSSEL, P. E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management.** FRAC Monograph n. 3, Cambridge CB2 5AN, UK, 2004.

SAS/STAT Version 9.1.3 of the SAS system for Windows, Copyright (c) 2002-2003 by SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

SARTORI, J. E. **Avaliação da sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas.** 2007. 57 fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp. 2007.

SCHROEDER, W. T.; PROVVIDENTI, R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. **Plant Disease Report**, v. 53, p. 271-275, 1969.

SCHMITZ, H. K.; MEDEIROS, C. A.; CRAIG, I. R.; STAMMLER, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylationinhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**. 2013.

SEAMAN, W. L., SHOEMAKER, R. A., PETERSON, E. A. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* on soybean. **Canadian Journal Botany**, v. 43, p. 1461 – 1469, 1965.

SHARVELLE, E. G. **The nature and uses of modern fungicides**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1961. 308 p.

SILVA, W. P. K.; MULTANI, D. S.; DEVERALL, B. J.; LYON, B. R. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus. **Australian Journal of Botany**, v. 43, n. 6, p. 609-618, 1995.

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

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: Hartman, G.L., Sinclair, J.B.; Rupe, J.C. **Compendium of soybean diseases**. 4 ed. St. Paul. American Phytopathological Society. 1999. p. 25-26.

SINGH, R.; SINGH, S. B.; SINGH, P. N. effect os envirommental conditions on development of antracnose os soybean. **Annais of Plant protection Sciences**, v. 1, n. 9, p. 146-147, 2001.

SNOW, J. P.; BERGGREN, J. R. Target spot: In: **Compendium of soybean diseases**. 3. Ed. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 1989, p. 27-28.

SOARES, R. M.; GODOY, C. V.; OLIVEIRA, M. C. N. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 333–338, 2009.

SOUZA, R. T. **Reação de cultivares e controle da antracnose da soja**. 2009. 106 fls. Tese (Doutorado em Agronomia) - Passo Fundo - RS, 2009.

STAMMLER, G.; SPEAKMAN, J. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. **Journal Phytopathology**, v. 154, p. 508-510, 2006.

STAMMLER, G.; BENZINGER, G.; SPEAKMAN, J. A rapid and reliable method for monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to boscalid. **Journal Phytopathology**, v. 155, p. 746-748, 2007.

SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 696 p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JERGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**, Oxon: CAB International, 1992. p. 1-26.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annu Review Phytopathol**, v. 37, p. 197–246, 1999.

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

TECNOLOGIAS de produção de soja – Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 268 p.

TERAMOTO, A. **Caracterização morfológica, fisiológica, isoenzimática e controle de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berky & Curt) Wei, agente causal da Mancha-alvo**. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás – GO, 2008.

TERAMOTO, A.; MACHADO, T. A.; NASCIMENTO, L. M.; MEYER, M. C.; CUNHA, M. G. Sensibilidade a fungicidas de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes do Estado de Goiás. In: **VI Congresso Brasileiro de Soja**, Cuiabá, Anais... CD-ROM. 12. 2012.

TIFFANY, L. H. The antracnose complex on soybean. **Review Applied Mycology**. Oxford, v. 30, p. 598-599, 1951.

TORGESON, D. C. Determination and Measurement of Fungitoxicity. In: TORGESON, D. C. **Fungicides: An Advanced Treatise**, NewYork: Academic Press, v. 1, p. 742, 1967.

TOZZE-JÚNIOR, H. J.; MELLO, B. A.; MASSOLA-JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum sp.* causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 77-79, 2006.

VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, P. F.; DEWDNEY, M. M. A rapid resazur in based microtiter assay to evaluate Qoi sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. **Plant Disease**, v. 96, p.1262-1270, 2012.

XAVIER, S. A., CANTERI, M. G., BARROS, D. C. M., GODOY, C. V. Sensitivity of *Corynespora cassiicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 431-435, 2013.

XAVIER, S. A.; KOGA, L. J.; BARROS, D. C. M.; CANTERI, M. G.; LOPES, I. O. N.; GODOY, C. V. Variação da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a inibidores de desmetilação. **Summa Phytopathologica**. v.41, n.3, p.191-196, 2015.

WYENANDT, A.; MAXWELL, N. L. Evaluating fungicide recommendations for vegetable crops in the United States: should more be done to limit the risks of fungicide resistance development?. **Journal of Extension**, v. 49, p.1-11, 2011.

YANG, H. C.; STEWART, J. M.; HARTMAN, G. L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* infecting soybean seed in arkansas, United States. **Plant Disease**, v. 97, 2013.

YANG, H. C.; HAUNDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a novel curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. **Mycologia**, v. 106, p. 32-42, 2014.

YORINORI, J. T. Levantamento e avaliação da situação de doenças dasoja na safra 1987/88. In: **Resultados de Pesquisa de soja, 1987/88**. Londrina, EMBRAPA – CNPSo, 1989. 158 p.

YORINORI, J. T. Epidemia de mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*) na cultivar FT-Estrela na safra 1995/96. In: **XVIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. Uberlândia, 1996. 319 p.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay. **Plant Disease**, p. 675-677, 2005.