



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HELEN PRUDENTE DA SILVA

**MÉTODOS DE MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DE
Corynespora cassicola A FUNGICIDAS INIBIDORES DA
SUCCINATO DESIDROGENASE**

Londrina
2020

HELEN PRUDENTE DA SILVA

**MÉTODOS DE MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DE
Corynespora cassiicola A FUNGICIDAS INIBIDORES DA
SUCCINATO DESIDROGENASE.**

Dissertação apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Agronomia da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti
Canteri

Co-orientadora: Dra. Cláudia Vieira Godoy

Londrina
2020

HELEN PRUDENTE DA SILVA

**MÉTODOS DE MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DE
Corynespora cassiicola A FUNGICIDAS INIBIDORES DA
SUCCINATO DESIDROGENASE**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Maurício Conrado Meyer
Embrapa Soja

Dr. Rafael Moreira Soares
Embrapa Soja

Londrina, 28 de fevereiro de 2020.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, pela vida, saúde, amor eterno, força, foco e inspiração. Ao meu esposo Victor, meu amor, por ser esta pessoa tão especial, por me ajudar sempre que preciso, pelo apoio nos momentos difíceis, por saber multiplicar a alegria de cada momento, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, pela compreensão transmitida nos momentos de ausência, por suportar e ficar sempre ao meu lado. Aos meus pais, minha avó e sogra pelo apoio em todos os momentos da minha trajetória.

Ao meu orientador Dr. Marcelo Giovanetti Canteri pelos anos de orientação e compreensão. Pela confiança e pelo exemplo de professor e pesquisador que ele é. A minha co-orientadora Dra. Cláudia Vieira Godoy, que desde o meu período de estágio, sempre me ensinou, sempre me apoiou e me deu conselhos valiosos, agradecê-la por toda ajuda e compreensão em todos os momentos, por ser um exemplo profissional a ser seguida, uma pessoa determinada, inteligente e muito amorosa e bondosa, enfim, pela paciência que teve comigo sempre. Agradeço a Sheila Xavier e a Flavia Mello, pela ajuda, apoio e por tornarem-se boas amigas que irei levar pra sempre em meu coração.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo apoio institucional e a Embrapa Soja pelo acolhimento, serviços prestados e estrutura oferecida, a todos os funcionários pelo profissionalismo e amizade dispensados durante o período em que estive na instituição. Principalmente ao Allan, Gisele, Alda, Nilson e o Luiz que nunca irei me esquecer, são pessoas maravilhosas.

Ao estagiário João Vitor que me ajudou na condução do experimento, pela amizade, ao Leonardo Mataram que sempre me apoiou e me ouviu, as estagiárias Ludiane e Manoela, a Adriana e Silvana que sempre me ajudaram no Laboratório de biotecnologia vegetal. Aos pesquisadores da Embrapa Maurício Meyer e Franscismar Correa Marcelino pela convivência durante minha pesquisa, amizade e ajuda recebida durante esse período. A pesquisadora Dra. Ivani de Oliveira Negrão Lopes, por toda ajuda com a estatística do trabalho, por ser tão atenciosa. A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo. A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

Epígrafe

Entrega o teu caminho ao SENHOR,
confia nele, e o mais Ele fará.
Salmos 37:5

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Ciclo das relações patógeno hospedeiro de <i>Corynespora cassiicola</i> em soja.....	17
Figura 4.1. Raspagem dos esporos e microtitulação colorimétrica.....	32
Figura 5.1. Resultado da concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxapiróxade no estado Mato Grosso.....	38
Figura 5.2. Resultado da concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxapiróxade no estado Paraná.....	39
Figura 5.3. Resultado da concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxapiróxade nos estados do MS, GO, MA e no Paraguai.....	40
Figura 5.4. Resultado do crescimento micelial em meio de cultura nas diferentes doses de fungicidas.....	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1.** Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola* presentes na Micoteca da Embrapa Soja (CMES), ano e local de coleta. Londrina, 2020.....28
- Tabela 5.1.** Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de coleta, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxaproxade. Londrina, 2020.....36
- Tabela 5.2.** Concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxaproxade comparando o método de microtitulação colorimétrica e a inibição de crescimento micelial. Londrina, 2020.....42

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	IMPORTÂNCIA DA SOJA.....	14
2.1.1.	MANCHA-ALVO	14
2.1.2.	CONTROLE.....	17
2.2.	FUNGITOXICIDADE.....	18
2.2.1.	MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA FUNGITOXICIDADE.....	18
2.2.2.	TESTES <i>IN VIVO</i>	19
2.2.3.	TESTES <i>IN VITRO</i>	20
2.3.	SENSIBILIDADE DE <i>Corynespora cassicola</i> A FUNGICIDAS	21
3.	ARTIGO: MÉTODOS DE MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DE CORYNESPORA CASSICOLA A FUNGICIDAS INIBIDORES DA SUCCINATO DESIDROGENASE.....	24
3	3.1 RESUMO	24
3.2	ABSTRACT.....	25
3.3	INTRODUÇÃO.....	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	ORIGEM DOS ISOLADOS E ISOLAMENTO	27
4.2	MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA.....	29
4.3	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL.....	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1.	MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA	33
5.2	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL.....	41
5.3	RELAÇÃO DOS MÉTODOS MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA x INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	43
	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS.....	47

DA SILVA, H. P. **Métodos de monitoramento da sensibilidade de *Corynespora cassiicola* a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase**. Dissertação de mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil, 2020.

RESUMO

O fungo *Corynespora cassiicola* causa a mancha-alvo na cultura da soja. A incidência dessa doença na cultura tem aumentado nas últimas safras em razão do aumento da semeadura de cultivares suscetíveis, da utilização de culturas hospedeiras do fungo em sucessão à soja, como o algodão e a crotalária, e da menor sensibilidade/resistência do fungo a fungicidas. Isolados do fungo com mutações de ponto que conferem menor sensibilidade a fungicidas já foram relatados para metil benzimidazol carbamato (MBC), inibidores da quinona externa (IQe) e inibidores da succinato desidrogenase (ISDH). O presente trabalho teve como objetivo determinar a concentração efetiva para controle de 50% (CE50) da população de *C. cassiicola* utilizando duas metodologias: microtitulação colorimétrica e crescimento radial micelial. Foram utilizados 53 isolados de *C. cassiicola* obtidos de folíolos de soja nos anos de 2018 (51), 2014 (1) e 2016 (1) e dois isolados de coleção de 1997 (1) e 1998 (1), num total de 55 isolados. Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata, dextrose e ágar (BDA). Para o método da microtitulação, esporos foram diluídos em meio de cultura YBA e adicionados às soluções dos fungicidas bixafen e fluxapiroxade nas concentrações de zero; 0,0125; 0,05; 0,2; 0,8; 20; 40 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em microplacas contendo 96 poços. Os valores da concentração efetiva para inibir 50% do crescimento do fungo (CE50) foram estimados a partir de leituras de absorbância a 540 nm. A partir do resultado da microtitulação foram selecionados 20 isolados com diferentes padrões de sensibilidade para a comparação com o método de inibição de crescimento micelial. Os 20 isolados de *C. cassiicola* foram cultivados em meio de cultura (BDA) com os fungicidas bixafen e fluxapiroxade nas doses de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após dez dias de incubação das placas foi realizada medições do crescimento micelial para estimativa da CE50. Os valores de CE50 pelo método de microtitulação colorimétrica variaram de 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 37,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bixafen e 0,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 44,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluxapiroxade. Quando os 20 isolados selecionados foram avaliados pelo método de inibição de crescimento micelial o maior valor de CE50 foi de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bixafen e 1,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluxapiroxade. Houve baixa correlação entre os métodos na discriminação de isolados menos sensíveis aos fungicidas avaliados. Os valores obtidos para CE50 utilizando a metodologia de microtitulação colorimétrica indicou a ocorrência de isolados de *Corynespora cassiicola* com menor sensibilidade aos fungicidas bixafen e fluxapiroxade, porém, os mesmos isolados foram sensíveis utilizando a metodologia de inibição de crescimento micelial.

Palavras-chave: Controle químico. Mancha-alvo. Carboxamida. Resistência.

DA SILVA, H. P. **Methods for monitoring the sensitivity of *Corynespora cassiicola* to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides.** Master thesis in Agronomy - State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil, 2020.

ABSTRACT

The fungus *Corynespora cassiicola* causes the target spot in the soybean crop. The incidence of this disease in the crop has been increased in the last crop seasons due to the increase in the sowing of susceptible cultivars, the use of host crops of the fungus in succession to soybeans, such as cotton and crotalaria, and the lower sensitivity/resistance of the fungus to fungicides. Isolates of the fungus with point mutations that confer less sensitivity to fungicides have been reported for methyl benzimidazole carbamate (MBC), quinone outside inhibitors (QoI) and succinate dehydrogenase inhibitors (SDH). The present work aimed to determine the effective concentration to control 50% (EC50) of the population of *C. cassiicola* using two methodologies: microtiter colorimetric and mycelial radial growth. Fifty-three isolates of *C. cassiicola* obtained from soybean leaflets in the years of 2018 (51), 2014 (1), and 2016 (1), and two isolates from collection from 1997 (1), and 1998 (1) were used, in a total of 55 isolates. The isolates were grown in potato, dextrose and agar (PDA). For the microtiter method, spores were diluted in Yeast Bacto Acetato culture medium and the solutions of the fungicides bixafen and fluxapyroxad were added at 0; 0.0125; 0.05; 0.2; 0.8; 20; 40 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentrations in microplates containing 96 wells. The EC50 values were estimated by absorbance readings at 540 nm. From the microtiter result, 20 isolates with different sensitivity patterns were selected for comparison with the mycelial growth inhibition method. The 20 isolates of *C. cassiicola* were grown in culture medium (BDA) amended with the fungicides at doses of 0; 0.5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 and 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$. After ten days of incubation, measurements of mycelial growth were performed to estimate the EC50. The EC50 values by the colorimetric microtiter method ranged from 0.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 37.80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for bixafen and 0.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 44.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for fluxapyroxad. When the 20 selected isolates were evaluated by the mycelial growth inhibition method, the highest EC50 value was 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for bixafen and 1.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for fluxapyroxade. The EC50 values obtained using the microtiter methodology indicated the occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates with less sensitivity to the fungicides bixafen and fluxapyroxade, however, the same isolates were sensitive using the mycelial growth inhibition methodology.

Keywords: Chemical control. Target spot. Carboxamide. Resistance.

1. INTRODUÇÃO

As doenças que incidem na cultura da soja são fatores limitantes na obtenção de altas produtividades. Na cultura da soja, no Brasil, são relatadas doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. A mancha-alvo da soja causado pelo fungo *Corynespora cassiicola* Berk. & M.A. Curtis C.T., tem apresentado maior incidência na cultura nas últimas safras, na maioria das regiões produtoras no Brasil (TECNOLOGIAS, 2013).

Os sintomas dessa doença podem ser observados nas folhas, no caule, nas vagens, nas sementes, no hipocótilo e nas raízes. Os sintomas típicos são observados nas folhas, com pontuações escuras envoltas por halo amarelado e, com a evolução, as manchas tornam-se circulares de coloração castanho-escura (GODOY et al., 2016).

As perdas ocasionadas por essa doença variam bastante com a cultivar. Em uma meta-análise com 41 experimentos realizados entre os anos de 2012 a 2016, em diferentes regiões produtoras do Brasil, com cultivares suscetíveis, foram observadas perdas variando entre 8% a 40,5% (MOLINA et al., 2019).

Além da soja, este patógeno pode infectar mais de 400 espécies de plantas (FARR; ROSSMAN, 2019), entre elas algumas importantes culturas como o algodão, o mamão, o tomate, a seringueira, e diversas plantas daninhas. Apesar dos resultados de testes de inoculações cruzadas mostrarem que alguns isolados são mais severos em seus hospedeiro de origem, sendo mais seletivos, por outro lado, isolados obtidos de soja e de algodão no Brasil infectam ambas as culturas (GALBIERI et al., 2014). Além de infectar uma ampla gama de hospedeiros, *C. cassiicola* pode sobreviver em sementes infectadas, restos de cultura e formar estruturas de sobrevivência, chamadas clamidósporos (OLIVEIRA et al., 2012).

O controle recomendado para este patógeno na cultura da soja é o uso de cultivares resistentes, a rotação de culturas com milho e espécies de gramíneas e o controle químico com fungicidas em cultivares suscetíveis (TECNOLOGIAS, 2013).

Com a introdução do fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. em 2001, causador da ferrugem-asiática na cultura da soja, tornou-se frequente as pulverizações de fungicidas na cultura, aumentando a pressão de seleção de resistência sobre todos os fungos (TECNOLOGIAS, 2013).

Fungicidas dos grupos químicos Metil Benzimidazol Carbamato (MBC),

Inibidores da Desmetilação (IDM) e Inibidores da Quinona externa (IQe) foram os primeiros utilizados na cultura da soja, isoladamente ou em mistura. Desde a safra 2013/14, fungicidas Inibidores da Succinato Desidrogenase (ISDH) tem sido utilizados no controle da ferrugem-asiática da soja, sendo fluxapirroxade o primeiro ingrediente ativo registrado desse grupo registrado no Brasil (AGROFIT, 2019).

Fungicidas ISDH desempenham um importante papel na proteção do plantas contra muitos gêneros de fungos. Essas moléculas se ligam à ubiquinona, local de ligação (sítio-Q) do complexo mitocondrial II, inibindo a respiração dos fungos e não apresentam resistência cruzada com outras classes químicas (AVENOT et al., 2008). Por serem fungicidas com modo de ação específicos, o uso frequente pode causar a seleção de resistência à população de patógenos no campo (DEKKER, 1987).

Resultados de meta-análise conduzido com experimentos realizados entre 2012 e 2016 no Brasil, mostraram maior eficiência de controle da mancha-alvo para os fungicidas contendo fluxapirroxade (ISDH) + piraclostrobina (IQe) (76,2%) e epoxiconazole (DMI) + fluxapirroxade (ISDH) + piraclostrobina (IQe) (75,7%) (MOLINA et al., 2019).

Uma das causas do aumento de incidência de *C. cassiicola* na cultura da soja é o aumento da semeadura de cultivares suscetíveis a essa doença e a menor sensibilidade/resistência do fungo a fungicidas MBC e IQe (XAVIER et al., 2013; TERAMOTO et al., 2017; FRAC, 2019). Isolados de *C. cassiicola* com resistência a ISDH também foram relatados na América do Sul. A análise molecular de isolados confirmou a presença de mutações no sítio alvo B-H278Y e C-N75S em isolados com sensibilidade reduzida. Esses isolados foram detectados no Mato Grosso e no Rio Grande do Sul e na Bolívia. Isolados analisados de Goiás, Minas Gerais e Paraná foram sensíveis (FRAC, 2019).

Quando ocorre menor eficiência de um fungicida no campo, há necessidade da comprovação da sensibilidade do fungo em laboratório. O fato dos fungicidas estarem formulados em misturas com dois e três modos de ação dificulta muitas vezes no campo a avaliação da sensibilidade. No laboratório, os bioensaios devem estar relacionados às respostas de sensibilidade no campo, devem ser confiável e repetível e o mais simples possível de operar em termos de tecnologia e habilidades do usuário. Outra necessidade da metodologia é ser o mais barato possível de operar e capaz de um alto rendimento em pouco tempo (RUSSEL, 2004).

Com base nestas informações, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* obtidos de folhas de soja em diferentes regiões produtoras utilizando dois diferentes métodos de monitoramento (microtitulação colorimétrica e inibição de crescimento micelial) aos fungicidas ISDH, bixafen e fluxaproxade.

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

Artigo: Métodos de monitoramento da sensibilidade de *Corynespora cassiicola* a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA DA SOJA

A soja, *Glycine max* (L.) Merr., é uma planta de ciclo anual, originária da China, uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo. No Brasil sua expansão vem ocorrendo desde a década de 70, com o interesse da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional por proteína vegetal (BORÉM, 1999).

Atualmente, a soja é cultivada em diversas regiões do país, motivadas pelo preço de mercado, e é o quarto grão mais produzido mundialmente sendo o primeiro no Brasil. É considerada fonte de proteína e óleo vegetal mais importante, em função da sua qualidade e baixo custo de produção (TECNOLOGIAS, 2013).

A área estimada de produção no Brasil é de 35,8 milhões de ha, semeados na safra 2018/19. A estimativa de produção nacional na safra de 2018/19 foi de 115,01 milhões de toneladas, contra 119,28 milhões na safra 2017/18, representando uma redução de 3,7% em decorrências das condições climáticas adversas que ocorreu em várias regiões produtoras (CONAB, 2019).

As doenças que ocorrem na cultura assumem papel importante na definição de produtividade. Perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 20%. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides já foram identificadas. Esse número cresce com a expansão da cultura para novas áreas e como consequência da monocultura intensiva (TECNOLOGIAS, 2013).

2.1.1. MANCHA-ALVO

A mancha-alvo é uma doença causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei, encontrada praticamente em todas as regiões produtoras de soja, tendo maior importância no cerrado brasileiro (SOARES et al., 2009). O fungo *C. cassiicola* pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Dothiomycetes*, ordem *Pleosporales* (SCHOCH et al., 2009). O fungo é capaz de infectar mais de 400 espécies de plantas de 380 gêneros diferentes (DIXON et al., 2009), sendo que muitas dessas espécies apresentam grande importância econômica, com destaque para: seringueira, soja, algodão, pepino, feijão, eucalipto, tomate, café (SILVA et al., 1995; DIXON et al., 2009; SOUZA et al., 2009; FARR; ROSSMAN, 2019).

O primeiro relato deste fungo na cultura da soja nos Estados Unidos foi em 1945 (OLIVE et al., 1945). Já no Brasil sua ocorrência foi relatada na cultura da soja por Yorinori no Estado do Paraná e por Almeida no Estado de São Paulo, em 1976 (ALMEIDA et al., 1976).

Os sintomas podem ser observados nas folhas, no caule, nas vagens, nas sementes, no hipocótilo e nas raízes. Sua ocorrência nas folhas inicia-se com pontuações castanho-avermelhada, envolto por halo amarelado, que evolui para grandes manchas circulares. Geralmente, as manchas apresentam uma pontuação escura no centro, semelhante a um alvo. Plantas severamente infectadas desfolham precocemente. Manchas pardo-avermelhadas podem ser observadas na haste e nas vagens. A infecção é favorecida por alta umidade relativa. Infecção em folhas, vagens e hastes, geralmente não estão associadas com a correspondente podridão de raiz (GODOY et al., 2016).

Essa doença pode ocorrer em qualquer fase do estágio fenológico da soja. Sua incidência é favorecida por alta umidade e uma vez os conídios depositados sobre a face da folha, aguardam temperatura ótima de 22 a 30°C (MULITERNO DE MELO, 2009). Para que ocorra a infecção na folha, a umidade relativa do ar deve estar em 80% aproximadamente, sendo o déficit hídrico um inibidor do crescimento deste patógeno (SNOW; BERGGREN, 1989).

O fungo *C. cassiicola* sobrevive em restos culturais de soja por até dois anos, atuando como fonte de novas epidemias (ALMEIDA et al., 2001). Este patógeno também pode sobreviver em plantas voluntárias, sementes de soja, em hospedeiros alternativos, caules, raízes e na forma de clamidósporos (estrutura de resistência) (SNOW; BERGGREN, 1989; OLIVEIRA et al., 2012). Sua disseminação é feita pelo vento sendo responsável pelo transporte dos conídios (Figura 2.1). A precipitação também é um dos agentes responsáveis pela disseminação, principalmente pela chuva e respingos de água de irrigação por aspersão (BEDENDO, 1995)

Yorinori (1992) e Snow; Berggren (1989) relataram a existência de diferentes raças de *C. cassiicola* na cultura da soja, uma delas infectando o hipocótilo, raízes e caule e a outra infectando folhas, vagens e sementes, causando os sintomas de mancha. Ambas as raças diferem morfológicamente umas das outras.

Uma vez dentro da planta hospedeira, o fungo pode liberar cassiicolina, uma toxina que mata os tecidos adjacentes ao local da infecção. O patógeno coloniza e se

reproduz sobre os tecidos necróticos. Várias espécies de plantas, incluindo a soja, apresentam sintomas semelhantes se forem provenientes de inoculações de conídios ou por injeção da toxina purificada. Isso demonstrou que a cassiicolina se comporta como uma toxina específica do hospedeiro, compartilhando o mesmo intervalo de hospedeiros do patógeno de origem (BARTHE et al., 2007). Seis isoformas da cassiicolina são conhecidas (cas1, cas2, cas3, cas4, cas5 e cas6), sendo as isoformas 1, 3, 4 e 5 relatadas apenas em isolados obtidos de seringueira e as isoformas 2 e 6 relatadas em isolados de diferentes hospedeiros, tais como soja e algodão (DÉON et al., 2014). Em casos raros, é possível haver dois genes codificando duas isoformas em um mesmo isolado; no entanto, em muitos isolados, nenhum gene precursor da cassiicolina é detectável, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos na virulência de *C. cassiicola* (DÉON et al., 2014).

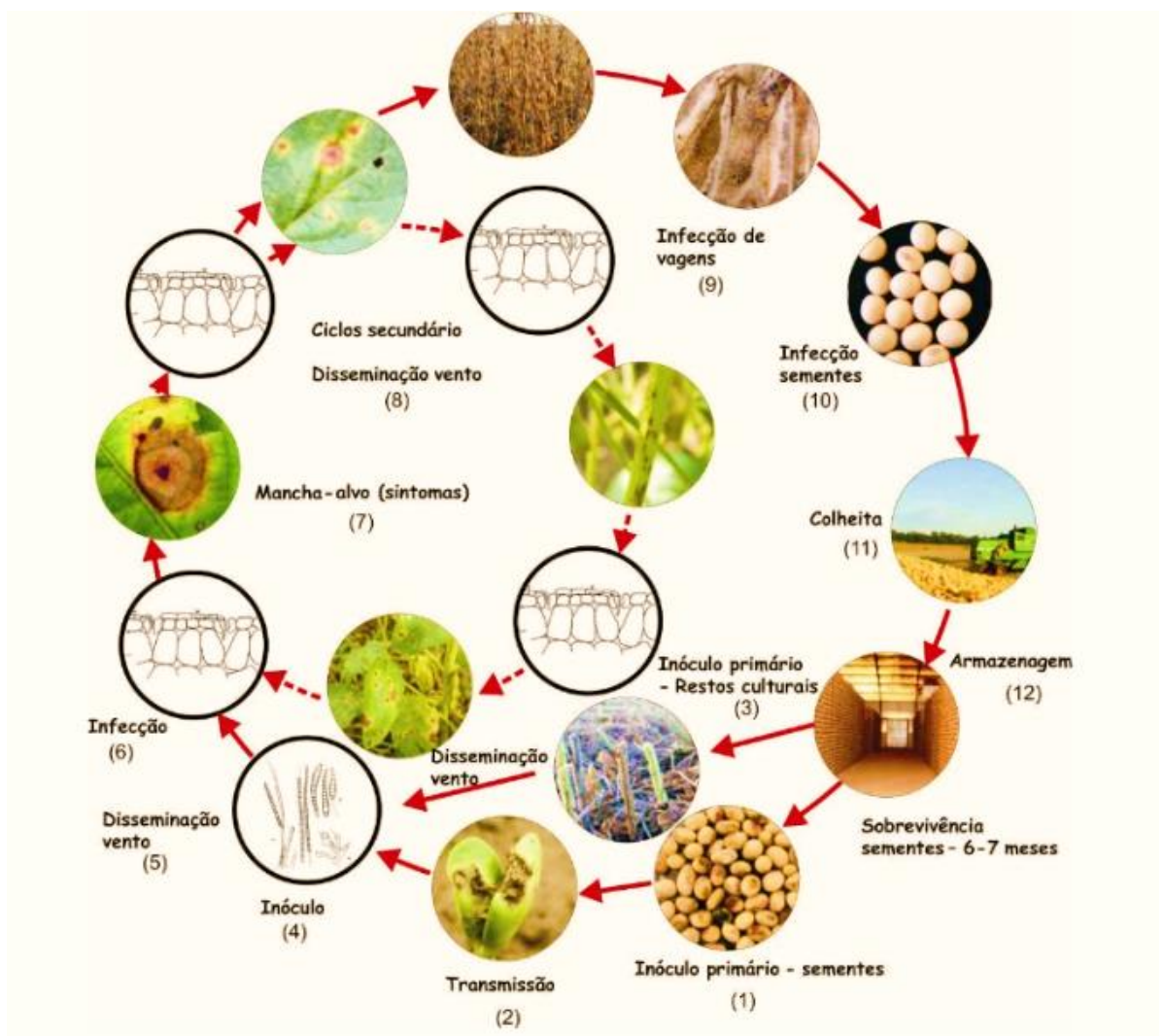


Figura 2.1. Ciclo das relações patógeno hospedeiro de *Corynespora cassiicola* em soja. Danelli et al., (2009) citado por Avozani, (2011).

2.1.2. CONTROLE

As perdas ocasionadas por doenças em plantas de importância econômica estão entre os principais fatores que causam prejuízos aos agricultores. O controle da maioria das doenças é eficiente somente quando adotado um programa de manejo integrado adequado (MULITERNO DE MELO, 2009). Para o controle da mancha-alvo são recomendadas: o uso de cultivares resistentes, o tratamento de sementes, a rotação/sucessão de culturas com milho e espécies de gramíneas e pulverizações com fungicidas em cultivares suscetíveis (HENNING et al., 2005; GODOY et al., 2016).

Dentre os principais modos de ação dos fungicidas sítio-específicos utilizados no controle de doenças na cultura da soja no Brasil, destacam-se os metil benzimidazol carbamatos (MBC), os inibidores da desmetilação (IDM), os inibidores da quinona externa (IQe) e a partir de 2013, os fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (ISDH) (TECNOLOGIAS, 2013). Fungicidas sítio-específicos são ativos contra um único ponto da via metabólica do patógeno ou contra uma única enzima ou proteína necessária para o fungo (McGRATH, 2004). Apesar da grande contribuição que os fungicidas sítio-específicos proporcionam no controle de doenças, seu uso intensivo pode ter como consequência a seleção isolados de fungos menos sensíveis ou resistentes (McGRATH, 2004).

Resultados de meta-análise conduzido com experimentos de campo realizados entre 2012 e 2016 no Brasil, mostraram maior eficiência de controle da mancha-alvo para os fungicidas contendo fluxapiroxade + piraclostrobina (76,2%) e epoxiconazole + fluxapiroxade + piraclostrobina (75,7%) (MOLINA et al., 2019). Eficiência intermediária foi observada para prothioconazole + trifloxistrobina (66,5%) e menor para mancozebe (49,6%), azoxistrobina + benzovindoflupir (46,7%) e carbendazim (32,4%). Na safra 2018/19, na análise de 19 experimentos em diferentes regiões produtoras, as maiores porcentagens de controle foram observadas nos tratamentos com fluxapiroxade + prothioconazol (80%) e bixafen + prothioconazol + trifloxistrobina (79%) seguido de piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxade (67%) e azoxistrobina + tebuconazol + mancozebe (67%) (GODOY et al., 2019).

2.2 FUNGITOXICIDADE

Fungitoxicidade é atribuída à molécula química do fungicida em função de suas características. Um fungo pode apresentar ou não sensibilidade a uma determinada molécula, em função de suas características genéticas. Se o fungo apresentar sensibilidade, conseqüentemente o fungicida apresentará fungitoxicidade, caso contrário, o fungo será considerado insensível (REIS et al., 2010).

A sensibilidade dos patógenos está relacionada à forma como o patógeno responde ao produto fitossanitário ou ingrediente ativo, não devendo ser comparado a palavra insensibilidade como sinônimo de resistência, pois esse termo sugere a resposta do patógeno para os quais os fungicidas nunca tiveram efeito (GHINI; KIMATI, 2000). Desta forma, fungos fitopatogênicos sensíveis a um determinado fungicida podem passar a apresentar menor sensibilidade ou tornar-se resistentes, devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade.

A fungitoxicidade de fungicidas é uma propriedade inerente a uma substância química e se caracteriza pela toxicidade aos fungos em baixas concentrações. Parâmetros como CE50 (concentração efetiva ou eficaz, que promove a inibição de 50% do desenvolvimento dos microorganismos), DE (dose efetiva), DL (dose letal), CL (concentração letal), CE (concentração efetiva), CI (concentração inibitória) ou CMI (concentração mínima inibitória) podem definir a fungitoxicidade de uma substância química (EDGINGTON et al., 1971; REIS et al., 2010).

2.2.1. MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA FUNGITOXICIDADE

Vários métodos têm sido descritos para avaliação da fungitoxicidade de uma substância química, tendo como objetivo o estudo da sensibilidade de um fungo a um determinado fungicida ou ainda o monitoramento da redução parcial ou mesmo a perda dessa sensibilidade (APS, 1947; SHARVELLE, 1961; GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004). Essas técnicas devem compreender ensaios *in vitro* ou *in vivo*, obedecendo as seguintes características: serem seguras, reproduzíveis, de simples operação em termos de praticidade e habilidade nas tecnologias utilizadas, de baixo custo e serem capazes de reproduzir as respostas de sensibilidade obtidas, em situações de campo (RUSSEL, 2004).

Um dos métodos mais utilizados para medir a sensibilidade de uma população de patógenos a fungicida e determinar CE50 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 de inibição de crescimento micelial apresenta desvantagens como necessidade de grande volume de meio de cultura, espaço e tempo para se obter os resultados (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 et al., 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 inibição de crescimento micelial. 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).

2.2.2. TESTES *IN VIVO*

Ensaio *in vivo* são utilizados em patógenos biotróficos, devido a sua incapacidade de crescer em meio de cultura sintéticos, ou seja, onde procedimentos *in vitro* não estejam compatíveis com os objetivos esperados. Esses ensaios também podem ser utilizados para patógenos necrotróficos, se a utilização de técnicas *in vitro* for considerada inapropriada (RUSSEL, 2004).

Algumas metodologias estão disponíveis e a escolha depende do patógeno alvo e das propriedades do fungicida. Essas, normalmente, incluem partes da planta destacadas (principalmente folhas), discos ou segmentos de folhas depositados sobre um meio de cultura contendo o fungicida ou em suspensão sobre uma solução do fungicida, ou, ainda, plântulas inteiras (GHINI; KIMATI, 2000; RUSSEL, 2004).

Para a ferrugem-asiática da soja, o método de folíolos destacados é descrito por Yeh (1983) em seus estudos para diferenciação de raças fisiológicas, sendo sua eficiência comprovada por outros autores (BURDON; MARSHALL, 1981; BANDYOPADHYAY et al, 2007; TWIZEYIMANA et al., 2007; ZAMBENEDETTI et al., 2007; LI et al., 2008), assim como sua correlação com resultados obtidos em casa de vegetação e campo (TWIZEYIMANA et al., 2007).

Outras metodologias são citadas, independente se o patógeno é um parasita obrigatório ou não, contudo, referindo-se somente ao monitoramento do grau de sensibilidade, como por exemplo: a utilização de armadilhas móveis para coleta de esporos, contendo plantas tratadas ou meio de cultura seletivo; placas para microtitulação, onde são colocados esporos do patógeno e meio de cultura com o fungicida sendo que, em 46 h, obtêm-se resultados por leitura da absorbância ou, ainda, pelo uso de técnicas moleculares para a detecção de linhagens resistentes, de baixa frequência na população do patógeno (GHINI; KIMATI, 2000).

2.2.3. TESTES *IN VITRO*

Testes *in vitro* podem ser direcionados tanto para patógenos necrotróficos como para biotróficos, embora, na sua maioria, envolvam os necrotróficos, em função da possibilidade de cultivo desses fungos em meio de cultura, ficando os biotróficos restritos à avaliação da germinação dos esporos (TORGESON, 1967; GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004). A exceção, dentro dos biotróficos, fica para *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary onde testes avaliando crescimento micelial são possíveis em meio de cultura específico (TORGESON, 1967; GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004). Se o patógeno alvo do estudo pode facilmente ser cultivado em meio de cultura, então os testes para a determinação de uma curva dose-resposta, para um fungicida, na maioria das vezes, serão desenvolvidos nessas condições. Normalmente, esses testes envolvem a utilização de meios de cultura sólidos, contudo, a utilização de meios líquidos também se torna possível, embora com restrições. As variáveis quantificadas incluem desde mensuração do crescimento micelial, da germinação de esporos, do comprimento do tubo germinativo, da morfologia do tubo germinativo ou, até mesmo, do incremento de turbidez (meio de cultura líquido) (GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004). Testes

avaliando a fungitoxicidade também podem ser desenvolvidos através da incorporação de suspensão de esporos a diferentes concentrações do fungicida teste. Essa técnica é limitada a patógenos que esporulam facilmente e que não apresentam restrição à germinação na ausência de oxigênio. A tendência de agregação dos esporos que se depositam no fundo do local onde é procedido o teste (cavidade de uma lâmina, tubo de ensaio), dificulta a avaliação (SHARVELLE, 1961).

2.3. SENSIBILIDADE DE *Corynespora cassiicola* A FUNGICIDAS

As aplicações sequenciais do mesmo fungicida podem levar a seleção de populações resistentes ou menos sensíveis. REIS et al., (2010) descreve a resistência como qualitativa quando há modificação de um único gene do patógeno, resultando na ineficiência do fungicida, mesmo aplicando uma dose maior que a recomendada. Na resistência quantitativa há interação de vários genes menores e se caracteriza por uma redução de eficiência do fungicida ao longo do tempo.

A resistência cruzada refere-se à resistência a dois ou mais ingredientes ativos, conferidas pelo mesmo fator genético. Existe ainda a resistência múltipla, onde fatores genéticos diferentes conferem resistência a dois ou mais ingredientes ativos com mecanismos de ação distintos (GHINI; KIMATI, 2000). O conhecimento da resistência cruzada é importante no desenvolvimento de novos fungicidas e na definição de estratégias antiresistência. Se o fungicida em pesquisa apresentar estrutura química ou mecanismo de ação semelhante a outro que já apresenta problemas de resistência, provavelmente, ocorrerá resistência cruzada (GHINI; KIMATI, 2000).

As medidas de controle utilizando produtos fitossanitários para mancha-alvo da soja têm sido estudadas através de pesquisa em campo, para verificar a eficiência dos diferentes ingredientes ativos (GODOY et al., 2016). Populações do fungo *C. cassiicola* resistentes a fungicidas metil benzimidazol carbamato (XAVIER et al., 2013) e inibidores da quinona externa (TERAMOTO et al., 2017; MELLO, 2019) tem sido observada no campo. A mutação G143A, que confere resistência completa a fungicidas IQe foi detectada em número significativo de amostras no Brasil em 2015 e 2016 em isolados de *C. cassiicola* no Mato Grosso, no Mato Grosso do Sul e no Paraná (FRAC, 2019; MELLO, 2019).

Ao longo dos anos, programas de pesquisa têm mostrado resultados de eficiência de fungicidas para controle da mancha-alvo. Os fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (ISDH) começaram a ser registrados na cultura da soja em 2013 e são importantes na proteção de plantas contra fitopatógenos. Estas moléculas ligam-se especificamente à ligação da ubiquina sítio (Q-site) do complexo mitocondrial II, inibindo a respiração fúngica. Devido ao seu modo único e sitio de ação, não há relatos de resistência cruzada com outras classes químicas como IQe ou MBC e são excelentes alternativas para o manejo da resistência a fungicidas (AVENOT; MICHAILIDES, 2008; LEROUX et al., 2003; STAMMLER et al., 2007; ZHANG et al., 2007). Os primeiros fungicidas ISDH utilizados foram a carboxinas no final dos anos 60 e tendo como espectro de ação doenças causadas por basidiomicetos (ZHANG et al., 2009). Em comparação com o antigo ISDHs, as novas moléculas como boscalida, pentiopirad ou fluopiram, atuam com um amplo espectro de atividade fúngica em várias culturas (STAMMLER et al., 2007; YANASE et al., 2007).

Boscalida teve sua liberação comercial deferida em 2003, sendo o primeiro representante dos novos ISDHs. Atualmente registrado como um agente eficaz contra *C. cassiicola*, embora a resistência das populações no campo ao boscalida tenha sido relatada dois anos após seu registro (MIYAMOTO et al. 2009).

A resistência boscalida foi relatada em isolados de *Alternaria alternata* no pistache (EUA), *Botrytis cinerea* na videira e morango, *Podosphaera xanthii* em cucurbitáceas e outras espécies em vários países (AVENOT et al., 2008; MCGRATH, 2008; MIAZZI; MCGRATH, 2008). No Japão em 2005, foi registrado comercialmente o boscalida para o controle do mofo-cinzento e podridão de esclerotínia em pepino e em 2006, para *C. cassiicola* em pepino. No entanto, após alguns anos de uso deste produto, foram relatados isolados resistentes em duas cidades na província de Ibaraki (MIYAMOTO et al., 2009). Posteriormente, isolados de *C. cassiicola* resistente ao boscalida se espalharam por todo Japão (USHIO; TAKEUCHI, 2009). Esses fungos tem mutações com substituições de aminoácidos nas subunidades SdhB ou SdhC (AVENOT; MICHAILIDES, 2008).

A perda de sensibilidade de isolados fornece evidências de falhas no controle de doenças (JUSTUM et al., 1998; RUSSELL, 2004). Essa sensibilidade ao boscalida foi relatada em vários patógenos (LU et al., 2004; AVENOT; MICHAILIDES, 2008; STAMMLER et al., 2007; ZHANG et al., 2007; MYRESIOTIS et al., 2008). Ishii e Nishimura (2007) relataram que a medição do crescimento micelial em boscalida

utilizando o meio líquido YBA pode avaliar a sensibilidade de *C. cassiicola*. Programas de monitoramento de resistência a fungicida são essenciais para avaliar a eficácia dos fungicidas e revelar mudanças precoces a sensibilidade dos patógenos a um fungicida, proporcionando uma oportunidade para modificar as recomendações dos princípios ativos.

O estabelecimento da sensibilidade inicial de um patógeno a um fungicida (linha base) é o primeiro passo para detectar resistência (JUSTUM et al., 1998; RUSSEL, 2004). Para *C. cassiicola*, valores CE50 para o fungicida boscalida foram obtidos utilizando o método de inibição de crescimento micelial para 220 isolados obtidos de pepino, tomate, berinjela, soja e feijão caupi, coletados em diferentes locais do Japão, sem uso anterior de fungicida ISDH. Os valores da linha base de sensibilidade variaram de 0,04 a 0,59 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIYAMOTO et al., 2009). Não houve diferenças em sensibilidade ao boscalida de acordo com diferentes hospedeiros ou localizações geográficas no Japão. Baseado nesse trabalho, o critério estabelecido para classificação de isolados a boscalida, utilizando o método de inibição de crescimento micelial em meio YBA foi: sensível (S, $\text{CE50} < 0,59 \text{ mg L}^{-1}$), moderadamente resistente (MR, $\text{CE50} = 1,1 - 6,3 \text{ mg L}^{-1}$), altamente resistente (HR, $\text{CE50} = 8,9 - 10,7 \text{ mg L}^{-1}$) e muito resistente (VHR, $\text{CE50} > 24,8 \text{ mg L}^{-1}$) (MIYAMOTO et al., 2009).

Teramoto et al. (2017) avaliando a CE50 para isolados de *C. cassiicola*, isolados de folhas de soja coletadas entre os anos de 1998 a 2013, pelo método de inibição de crescimento micelial em BDA, obteve valores inferiores a primeira dose avaliada, de 0,16 mg L^{-1} , a 1,76 para fluxaproxade. No trabalho de Teramoto et al. (2017) alguns isolados da coleção da Embrapa Soja (MES 312, 317 e 322) coletados entre 1997 e 2001, apresentarem valores de CE50 acima de 91 mg L^{-1} . Esses isolados vêm apresentando resultados inconsistentes em outros estudos (MELLO, 2019).

No Brasil, resultados preliminares de ensaios em laboratório mostraram a presença de isolados de *C. cassiicola* de soja com sensibilidade reduzida para os fungicidas ISDH em populações coletadas na safra 2017/2018 (FRAC, 2018). As mutações *sdhB-H278Y* e *sdhC-N75S* que conferem menor sensibilidade do fungo a fungicidas ISDH foram relatadas pelo FRAC em 2018.

3. ARTIGO: MÉTODOS DE MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DE *CORYNESPORA CASSIICOLA* A FUNGICIDAS INIBIDORES DA SUCCINATO DESIDROGENASE

3.1 RESUMO

A mancha-alvo, causado pelo fungo *Corynespora cassiicola*, pode ser controlada pela aplicação de fungicidas e um dos grupos químicos mais utilizados recentemente são os inibidores da succinato desidrogenase (ISDH). No entanto, aplicações excessivas podem contribuir para a seleção de populações menos sensíveis. O presente trabalho teve como objetivo avaliar dois diferentes métodos de monitoramento da sensibilidade aos fungicidas ISDH, bixafen e fluxapiroxade. Isolados de *C. cassiicola* foram obtidos de folhas de soja em diferentes regiões produtoras. Para determinar a concentração efetiva para controle de 50% (CE50) da população de *C. cassiicola* foi utilizado duas metodologias: microtitulação colorimétrica e crescimento radial micelial com diferentes doses dos fungicidas. Os valores de CE50 pelo método de microtitulação colorimétrica variou de 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 37,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bixafen e de 0,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 44,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluxapiroxade. Foram selecionados 20 isolados para avaliação pelo método de inibição de crescimento micelial. O maior valor de CE50 foi de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bixafen e 1,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluxapiroxade. Os valores obtidos para CE50 utilizando a metodologia de microtitulação colorimétrica indicou a ocorrência de isolados de *C. cassiicola* com menor sensibilidade aos fungicidas bixafen e fluxapiroxade, porém, os mesmos isolados foram sensíveis utilizando a metodologia de inibição de crescimento micelial.

Palavras-chave: Controle químico. Mancha-alvo. Carboxamida. Resistência

3.2 ABSTRACT

Target spot, caused by the fungus *Corynespora cassiicola*, can be controlled by fungicide application which most used chemical group is the succinate dehydrogenase inhibitors (ISDH). However, excessive applications can contribute to the selection of less sensitive populations. This study aimed to evaluate two different methods of sensitivity monitoring to ISDH fungicides, bixafen and fluxapyroxad. *Corynespora cassiicola* isolates were obtained from soybean leaves in different producing regions. To determine the effective concentration to control 50% (EC50) of the population of *C. cassiicola*, two methodologies were used: colorimetric microtiter and mycelial radial growth with different doses of fungicides. The EC50 values by the colorimetric microtiter method ranged from 0.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 37.80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for bixafen and from 0.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 44.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for fluxapyroxad. Twenty isolates were selected for evaluation using the mycelial growth inhibition method. The highest EC50 value was 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for bixafen and 1.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for fluxapyroxad. The values obtained for EC50 using the colorimetric microtiter methodology indicated the occurrence of *C. cassiicola* isolates less sensitive to the fungicides bixafen and fluxapyroxad, however, the same isolates were sensitive using the mycelial growth inhibition methodology.

Keywords: Chemical control. Target spot. Carboxamide. Resistance.

3.3 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que ocorrem na cultura da soja, a mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & M. A. Curt) C. T. Wei é encontrada em praticamente todas as regiões de cultivo de soja do Brasil. O fungo *C. cassiicola* pode sobreviver em restos de cultura e sementes infectadas, sendo essa uma das formas de disseminação (SOARES et al., 2009).

No entanto, com a utilização de cultivares suscetíveis e a menor sensibilidade do fungo às aplicações de fungicidas, as perdas de produção podem chegar a 50% (GODOY et al., 2017). Durante anos, a aplicação de grupos de metil benzimidazol carbamato (MBC), inibidor externo de quinona (QoI), inibidores de desmilitação (DMI) e recentemente fungicidas de fungicidas inibidores de desidrogenase (SDHI) tem sido utilizado para o controle da doença.

Experimentos têm sido conduzidos, em condições de campo, visando o controle químico da mancha-alvo, avaliando a eficiência de diferentes fungicidas e identificando o melhor momento para aplicação (MOREIRA et al., 2010). A preocupação se deve principalmente pela menor sensibilidade/resistência do fungo a fungicidas MBC e IQe (XAVIER et al., 2013; TERAMOTO et al., 2017; FRAC, 2019). Isolados de *C. cassiicola* com resistência a ISDH também foram relatados na América do Sul.

Quando ocorre menor eficiência de um fungicida no campo, há necessidade da comprovação da sensibilidade do fungo em laboratório. Parâmetros como a EC50 (concentração efetiva para controlar 50% do crescimento da população em estudo) definem a fungitoxicidade de uma substância química (SHARVELLE 1961; EDGINGTON et al., 1971; LOOMIS, 1995; SILVA et al., 2006). Valores da EC50, para diferentes fungicidas e específicos para *C. cassiicola* são escassos na literatura, contudo muito úteis na condução de trabalhos de pesquisa e monitoramento da variação da sensibilidade de patógenos, principalmente em regiões onde a demanda pelo uso de fungicidas na cultura é intensa (TERAMOTO et al., 2005).

O objetivo do trabalho foi avaliar dois diferentes métodos de monitoramento da sensibilidade aos fungicidas ISDH, bixafen e fluxaproxade, em isolados de *C. cassiicola* obtidos de folhas de soja obtidos de diferentes regiões produtoras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DOS ISOLADOS E ISOLAMENTO

Os isolados foram coletados de folíolos de soja infectados com *C. cassiicola* provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil em 2014, 2016 e 2018 (Tabela 4.1).

O isolamento foi realizado de forma indireta de folhas com sintomas típicos de mancha-alvo. Fragmentos das margens das lesões foram retirados e transferidos para solução de álcool etílico 70%, solução desinfetante de hipoclorito 0,5% mantendo-os imersos na solução por 1 min e depois transferidos para água destilada esterilizada. Com o auxílio de uma pinça flambada foram removidos os fragmentos da solução e transferidos para placas contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (4 g L⁻¹ de extrato de batata, 20 g L⁻¹ de dextrose, 15 g L⁻¹ ágar) e mantendo em câmara de crescimento (BOD) ± 25 °C por sete dias. Em seguida foi feito a repicagem para uma nova placa com meio de cultura BDA para purificação dos isolados. No total, foram obtidos 52 isolados de *C. cassiicola*, coletados em diferentes estados brasileiros e um isolado do Paraguai durante as safras de 2014, 2016 e 2018. Os isolados 312 (1997) e 313 (1998) pertencem a micoteca da Embrapa Soja e foram isolados antes do uso intensivo de fungicidas, sendo utilizados para comparação entre isolados sensíveis e resistentes.

Tabela 4.1. Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola* presentes na Micoteca da Embrapa Soja (CMES), ano e local de coleta. Londrina, 2020.

CÓDIGO	ANO	MUNICÍPIO	ESTADO
CMES 312	1997	Itiquira	MT
CMES 313	1998	Nova Mutum	MT
CMES 1474	2014	Sinop	MT
CMES 1736	2016	Tangará da Serra	MT
CMES 1980	2018	Rio Verde	GO
CMES 1984	2018	Maracaju	MS
CMES 1985	2018	Maracaju	MS
CMES 1986	2018	Maracaju	MS
CMES 1988	2018	Campo Novo do Parecis	MT
CMES 1991	2018	Campo Novo do Parecis	MT
CMES 2000	2018	Campo Novo do Parecis	MT
CMES 2002	2018	Campo Mourão	PR
CMES 2004	2018	Bela Vista do Paraíso	PR

CMES 2005	2018	Bela Vista do Paraíso	PR
CMES 2007	2018	Bela Vista do Paraíso	PR
CMES 2011	2018	Lucas do Rio Verde	MT
CMES 2012	2018	Lucas do Rio Verde	MT
CMES 2013	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2014	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2015	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2016	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2017	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2018	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2024	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2025	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2026	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2027	2018	Primavera do Leste	MT
CMES 2029	2018	Deciolândia	MT
CMES 2030	2018	Deciolândia	MT
CMES 2031	2018	Deciolândia	MT
CMES 2032	2018	Deciolândia	MT
CMES 2035	2018	Deciolândia	MT
CMES 2036	2018	Campo Mourão	PR
CMES 2037	2018	Campo Mourão	PR
CMES 2038	2018	Campo Mourão	PR
CMES 2039	2018	Campo Mourão	PR
CMES 2040	2018	Campo Mourão	PR
CMES 2041	2018	Itambé	PR
CMES 2044	2018	Doutor Camargo	PR
CMES 2045	2018	Doutor Camargo	PR
CMES 2046	2018	Doutor Camargo	PR
CMES 2047	2018	Doutor Camargo	PR
CMES 2053	2018	Chapadão do Sul	MS
CMES 2061	2018	Hermnandarias*	
CMES 2064	2018	Santa Fé	PR
CMES 2066	2018	Rolândia	PR
CMES 2072	2018	Rolândia	PR
CMES 2075	2018	Campos Novos Paulista	SP
CMES 2078	2018	Londrina	PR
CMES 2080	2018	Londrina	PR
CMES 2083	2018	Londrina	PR
CMES 2084	2018	Rondonópolis	MT
CMES 2085	2018	Bela Vista do Paraíso	PR
CMES 2086	2018	Bela Vista do Paraíso	PR
CMES 2088	2018	Tasso Fragoso	MA

*Paraguai

4.2 MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA

Foram utilizados os ingredientes ativos formulados dos fungicidas ISDH fluxapiroxade (100 g i.a./l) e bixafen (125 g i.a./l), fornecidos pela BASF e Bayer, respectivamente.

Para medir a sensibilidade de *C. cassiicola* aos fungicidas ISDH utilizando o método de microtitulação colorimétrica, os isolados de *C. cassiicola* foram cultivados em BDA por 10 dias a 25°C, fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro em BOD. O micélio dos isolados foram raspados com lâmina estéril e adicionado meio líquido 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). Foram utilizadas microplacas contendo 96 poços, nas quais foram depositados esporos dos isolados de *C. cassiicola* em concentração de 10^5 esporos mL⁻¹, ajustados com auxílio de hemacitômetro (Figura 4.1).

Foram adicionados os fungicidas fluxapiroxade e bixafen nas concentrações de zero; 0,0125; 0,05; 0,2; 0,8; 20; 40 e 100 µg mL⁻¹. Os fungicidas foram previamente preparados em solução estoque com água estéril na concentração de 300 µg mL⁻¹, seguido de diluições seriadas até obter as concentrações finais.

Para determinar a sensibilidade de cada isolado aos fungicidas por meio do teste de microtitulação colorimétrica, foram adicionados 50 µL da suspensão de 10^5 esporos mL⁻¹ em cada poço da microplaca, seguido da adição de 50 µL das diferentes concentrações dos fungicidas, 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). Em cada microplaca foi deixada uma testemunha que chamamos de branco (YBA + água destilada autoclavada). As microplacas foram tampadas e envoltas por filme plástico e colocadas em mesa agitadora a 150 rpm por uma hora, para possibilitar a mistura dos fungicidas com a suspensão de esporos. As microplacas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 25°C, fotoperíodo de 12/12 horas por sete dias. Os experimentos foram repetidos.

Após 7 dias, a absorbância foi medida em leitor de microplacas (ASYS, Eugendorf, Austria) no comprimento de onda de 540 nm. O valor da absorbância final calculado pela subtração da absorbância da amostra branco (YBA + fungicida) pela absorbância dos isolados.

Para calcular os valores de CE50 para cada isolado foi utilizado o modelo de

regressão linear probit analisando os valores de dose-resposta de cada isolado.

A descrição da potência e da eficácia do fungicida pôde ser demonstrada pela curva de dose-resposta, onde foram definidos os valores das doses/concentrações efetivas (TORGESON, 1967). A posição da curva de dose-resposta, no eixo da dose, representou o índice da potência indicando a quantidade para produzir determinado efeito. O limite superior da curva da dose-resposta indicou a eficácia do fungicida e referiu-se à resposta máxima que pôde ser provocada por ele. Normalmente, a eficácia foi o fator mais decisivo para sua escolha (Beckon et al., 2008). Os parâmetros do modelo probit e as estimativas das CE50 foram obtidos utilizando o sistema SAS®. O coeficiente de Pearson foi usado para verificar a qualidade do ajuste ($p > 0,01$).

Foi verificada na análise estatística e na análise da curva de dose-resposta gerada pelo programa a interação entre as repetições e falta de repetibilidade dos experimentos. Desta forma, foram analisadas apenas uma das repetições para os isolados CMES 1736, 1984, 1985, 1986, 1991, 2002, 2017, 2027, 2036, 2038, 2041, 2045, 2046, 2047, 2061, 2064, 2072, 2078, 2080, 2084.

Isso pode ter ocorrido devido a variação da quantidade dos esporos depositadas nos poços nas microplacas em razão da pequena unidade amostral ou variabilidade do patógeno. Em função da variabilidade obtida na repetições foram selecionados 20 isolados com diferentes classificações de CE50 para avaliação pelo método de inibição de crescimento micelial contendo meio de cultura sólido (BDA) com fungicida.

Os valores de CE50 obtidos pelo método de microtitulação colorimétrica foram relacionados aos valores obtidos pelo método de crescimento micelial para os 20 isolados selecionados.



Figura 4.1. Raspagem dos esporos e microtitulação colorimétrica.

4.3 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

A partir do resultado do teste de microtitulação, foram selecionados 20 isolados com diferentes CE50 para a comparação com o teste de crescimento micelial. A sensibilidade dos isolados ao bixafen e fluxapiroxade foi estimada com base na inibição do crescimento radial de colônias em meio BDA. Os fungicidas foram dissolvidos em água destilada autoclavada para obter soluções estoque de 100, 1000 e 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir destas soluções, foram feitas diluições seriadas, resultando em 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os fungicidas foram incorporados ao meio BDA fundente e o meio de cultura vertido em placas de Petri (20 mL por placa). Discos de micélio de 6 mm de diâmetro de cada um dos isolados de *C. cassicola* foram retirados das bordas das colônias com aproximadamente 10 dias de idade e transferidos para as placas com meio de cultura com diferentes concentrações de fungicida. As placas foram divididas em quatro subunidades perpendiculares, contendo dois isolados com duas repetições.

Foram realizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada placa uma repetição, adotando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. As placas foram incubadas em BOD por cinco dias, na temperatura de 25°C e regime de 12/12 horas de luz/ escuro. A avaliação do crescimento micelial foi realizada por medições do diâmetro da colônia do fungo em dois eixos perpendiculares e

posteriormente obtida a média entre os eixos. A área, foi estimada assumindo-se que o mesmo possui forma elipsoidal ($A=\pi \cdot d1 \cdot d2$), onde A é a área; $\pi=3,14$; d1=diâmetro 1 e d2=diâmetro 2. Esses valores foram aplicados em programa estatístico

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA

Para os isolados coletados em 1997 (CMES 312) e 1998 (CMES 313) os valores de CE50 foram de 0,02 e 0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bixafen e 0,69 e 0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluxapirroxade. Por não haver uma linha base de sensibilidade estabelecida para a utilização da microtitulação, neste trabalho adotou-se a classificação: Sensível (S) $\text{CE50} \leq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; Moderadamente Resistente (MR), $\text{CE50} > 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Altamente Resistente (AR), $\text{CE50} \geq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A CE50 estimada dos isolados coletados a partir de 2014 variou de 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 37,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bixafen e 0,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 44,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluxapirroxade (Tabela 5.1). Para o fungicida bixafen 56,3% dos isolados apresentaram inibição abaixo de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 16,3% dos isolados cresceram acima de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CMES 1736, 1980, 2014, 2024, 2029, 2031, 2035, 2041, 2080). Para o fungicida fluxapirroxade 52,7% dos isolados apresentaram inibição abaixo de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 18,8 % dos isolados cresceram acima de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CMES 1736, 2005, 2014, 2029, 2031, 2032, 2035, 2041, 2078, 2080) (Tabela 5.1).

O grupo de fungicidas ISDH começou a ser aplicado em soja no Brasil, em misturas com IQe em 2013 para controle de *Phakopsora pachyrhizi* que causa a ferrugem-asiática (GODOY; MEYER, 2014).

Nenhum dos isolados apresentou crescimento em dose acima de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Entre os isolados resistentes, CMES 1736, 2014, 2029, 2031, 2035, 2041, 2080 foram classificados como altamente resistentes simultaneamente aos dois ingrediente ativos, com valor de CE50 maior que 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os isolados com alta resistência observados apenas para o fungicida bixafen foram CMES 1980, 2014, 2024 sendo estes do estado do Goiás (1980) e do Mato Grosso (2014 e 2024), respectivamente. Para fluxapirroxade, os isolados CMES 2005 e 2078, coletados ambos no estado do Paraná, foram altamente resistentes somente o fungicida fluxapirroxade.

O isolado que apresentou o maior valor de CE50 foi o CMES 2041 com 37,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ingrediente ativo bixafen, sendo este também classificado como altamente resistente para fluxapirroxade, apresentando valor de 11,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ainda para o fungicida bixafen os isolados que apresentaram $\text{CE50} > 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$, classificados como moderadamente resistentes foram CMES 2002, 2004, 2066,

2072, 2078 (Paraná) (Tabela 5.1, Figura 5.2), 1474, 2012, 2016, 2017, 2025, 2032, 2083 (Mato Grosso) (Tabela 5.1, Figura 5.1), 2053 (Mato Grosso do Sul), 2061 (Paraguai), 2088 (Maranhão) (Tabela 5.1, Figura 5.3). Para fluxapiroxade foram encontrados 9 isolados moderadamente resistentes: CMES 2007 (Paraná), 2016, 2017, 2025 (Mato Grosso) 1984, 1985, 2053 (Mato Grosso do Sul), 1980 (Goiás) e 2061 (Paraguai) (Tabela 5.1). Os Isolados CMES 1988, 2013, 2046, 2072, 2085, 2065, não tiveram valores de CE50 estimado, devido ao seu valor de inibição ser abaixo da menor dose avaliada ($<0,0125 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Todos os isolados testados para bixafen e fluxapiroxade apresentaram inibição do crescimento micelial acima da maior dose $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A eficiência do uso de fungicidas para o controle da mancha-alvo em soja é relatada por diferentes autores (CABRAL et al., 2016; AVOZANI et al., 2014; XAVIER et al., 2013). Em estudo conduzido por Godoy et al. (2014), onde foram avaliados a eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo em soja, na safra 2013/14, o tratamento a base de piraclostrobina + fluxapiroxade apresentou menor severidade da doença e maior controle em relação à testemunha. Belufi et al. (2015), em avaliações da eficiência de programas de fungicidas para o controle de doenças na cultura da soja no Mato Grosso, também encontraram melhores índices de controle e menores taxas de desfolha com os tratamentos contendo a mistura de piraclostrobina + fluxapiroxade. A elevada eficiência fúngica do fluxapiroxade foi associada ao controle do fungo *Corynespora cassiicola* (MEYER et al., 2013; TERAMOTO et al., 2012).

O método de microtitulação colorimétrica vem sendo recomendado pelo FRAC para testar a sensibilidade de vários agentes fitopatogênicos como *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, 2016). Uma das limitações desse método é a contaminação microbiana nas células da microplaca, podendo ocorrer variação na CE50 uniformemente nas repetições, que são realizadas lado a lado na mesma placa.

Em razão das variações observadas na repetição do experimento, que pode ser atribuída ou a variações do fungo *C. cassiicola* que apresenta grande variabilidade genética (SOUSA; BENTES, 2014) ou a contaminação das microplacas, foram selecionados 20 isolados com diferentes CE50 para avaliação pelo método de inibição de crescimento micelial e comparação dos resultados.

Tabela 5.1. Código de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, ano e local de coleta, e concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxapiroxade. Londrina, 2020.

Isolado	Ano	Município, Estado, País	bixafen		fluxapiroxade	
			CE50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade	CE50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade
CMES 312	1997	Itiquira, MT, Brasil	0,11	S	0,75	S
CMES 313	1998	Nova Mutum, MT, Brasil	0,02	S	0,69	S
CMES 1474	2014	Sinop, MT, Brasil	3,70	MR	5,70	S
CMES 1736	2016	Tangará da Serra, MT, Brasil	15,80	AR	22,50	AR
CMES 1980	2018	Rio Verde, GO, Brasil	33,80	AR	4,30	MR
CMES 1984	2018	Maracaju, MS, Brasil	0,82	S	4,40	MR
CMES 1985	2018	Maracaju, MS, Brasil	0,12	S	1,50	MR
CMES 1986	2018	Maracaju, MS, Brasil	0,28	S	0,34	S
CMES 1988	2018	Campo Novo do Parecis, MT, Brasil	0,27	S	<0,0125	S
CMES 1991	2018	Campo Novo do Parecis, MT, Brasil	0,34	S	0,35	S
CMES 2000	2018	Campo Novo do Parecis, MT, Brasil	0,35	S	0,34	S
CMES 2002	2018	Campo Mourão, PR, Brasil	6,90	MR	0,62	S
CMES 2004	2018	Bela Vista do Paraíso, PR, Brasil	4,10	MR	0,79	S
CMES 2005	2018	Bela Vista do Paraíso, PR, Brasil	0,79	S	14,00	AR
CMES 2007	2018	Bela Vista do Paraíso, PR, Brasil	0,82	S	2,30	MR
CMES 2011	2018	Lucas do Rio Verde, MT, Brasil	0,71	S	0,19	S
CMES 2012	2018	Lucas do Rio Verde, MT, Brasil	3,30	MR	0,42	S
CMES 2013	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	0,05	S	<0,0125	S
CMES 2014	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	24,10	AR	21,70	S
CMES 2015	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	0,23	S	0,47	S
CMES 2016	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	1,20	MR	1,40	MR
CMES 2017	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	0,03	MR	8,30	MR
CMES 2018	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	0,27	S	0,37	S
CMES 2024	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	11,80	AR	0,80	S

CMES 2025	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	1,30	MR	1,10	MR
CMES 2026	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	0,91	S	0,66	S
CMES 2027	2018	Primavera do Leste, MT, Brasil	0,18	S	0,63	S
CMES 2029	2018	Deciolândia, MT, Brasil	21,70	AR	23,30	AR
CMES 2030	2018	Deciolândia, MT, Brasil	0,46	S	0,35	S
CMES 2031	2018	Deciolândia, MT, Brasil	30,80	AR	25,90	AR
CMES 2032	2018	Deciolândia, MT, Brasil	8,60	MR	20,60	AR
CMES 2035	2018	Deciolândia, MT, Brasil	30,20	AR	30,10	AR
CMES 2036	2018	Campo Mourão, PR, Brasil	0,06	S	0,19	S
CMES 2037	2018	Campo Mourão, PR, Brasil	0,75	S	0,75	S
CMES 2038	2018	Campo Mourão, PR, Brasil	0,20	S	0,58	S
CMES 2039	2018	Campo Mourão, PR, Brasil	0,32	S	0,81	S
CMES 2040	2018	Campo Mourão, PR, Brasil	0,35	S	0,41	S
CMES 2041	2018	Itambé, PR, Brasil	37,80	AR	11,80	AR
CMES 2044	2018	Doutor Camargo, PR, Brasil	0,49	S	0,34	S
CMES 2045	2018	Doutor Camargo, PR, Brasil	0,58	S	0,40	S
CMES 2046	2018	Doutor Camargo, PR, Brasil	0,27	S	<0,0125	S
CMES 2047	2018	Doutor Camargo, PR, Brasil	0,92	S	0,42	S
CMES 2053	2018	Chapadão Do Sul, MS, Brasil	3,90	MR	1,70	MR
CMES 2061	2018	Hermnandarias, Paraguai	2,10	MR	1,20	MR
CMES 2064	2018	Santa Fé, PR, Brasil	0,99	S	2,20	S
CMES 2066	2018	Rolândia, PR, Brasil	1,10	MR	0,83	S
CMES 2072	2018	Rolândia, PR, Brasil	3,50	MR	<0,0125	S
CMES 2075	2018	Londrina, PR, Brasil	0,39	S	0,38	S
CMES 2078	2018	Londrina, PR, Brasil	3,20	MR	44,40	AR
CMES 2080	2018	Londrina, PR, Brasil	26,90	AR	38,30	AR
CMES 2083	2018	Rondonópolis, MT, Brasil	1,60	MR	0,28	S
CMES 2084	2018	Bela Vista Do Paraíso, PR, Brasil	1,00	S	0,99	S

CMES 2085	2018	Bela Vista Do Paraíso, PR, Brasil	0,07	S	<0,0125	S
CMES 2086	2018	Bela Vista Do Paraíso, PR, Brasil	0,39	S	0,18	S
CMES 2088	2018	Tasso Fragoso, MA, Brasil	1,20	MR	0,98	S

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, $CE_{50} \leq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

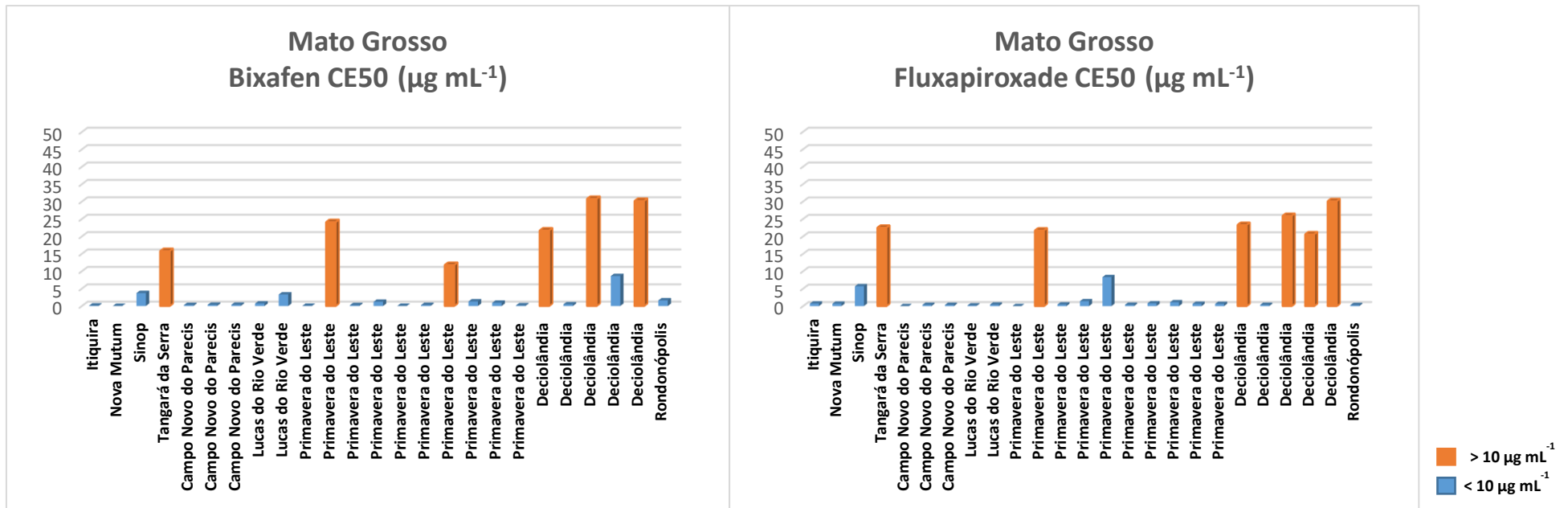


Figura 5.1. Resultado da concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE_{50} – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxapiraxade no estado Mato Grosso.

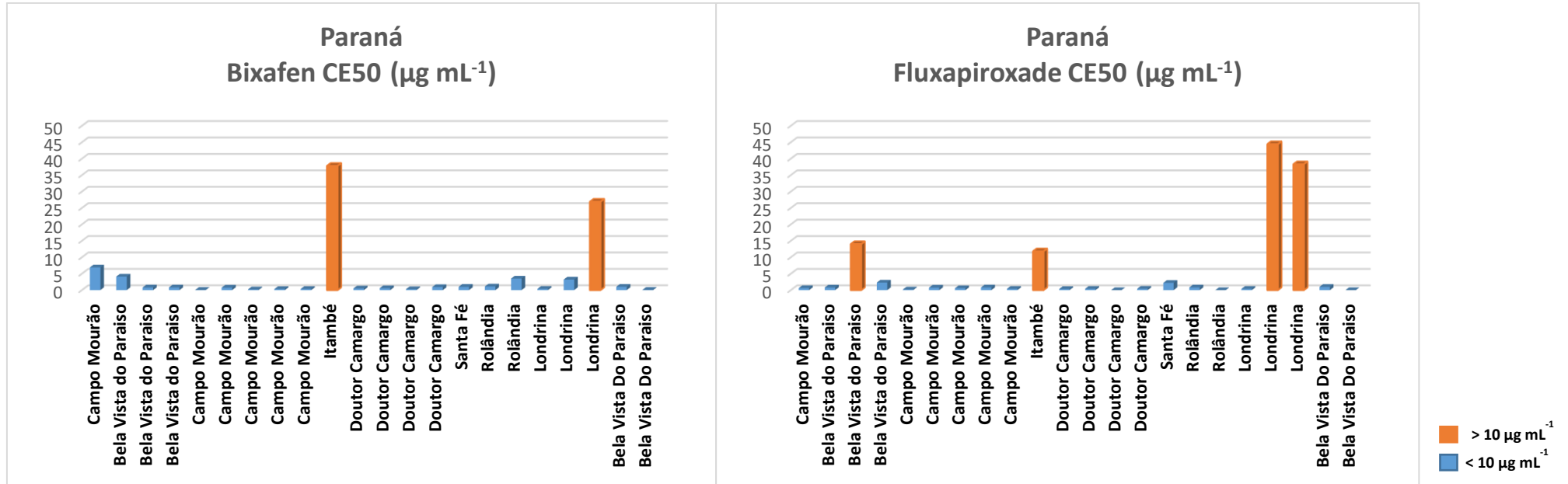


Figura 5.2 Resultado da concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxapiraxade no estado Paraná.

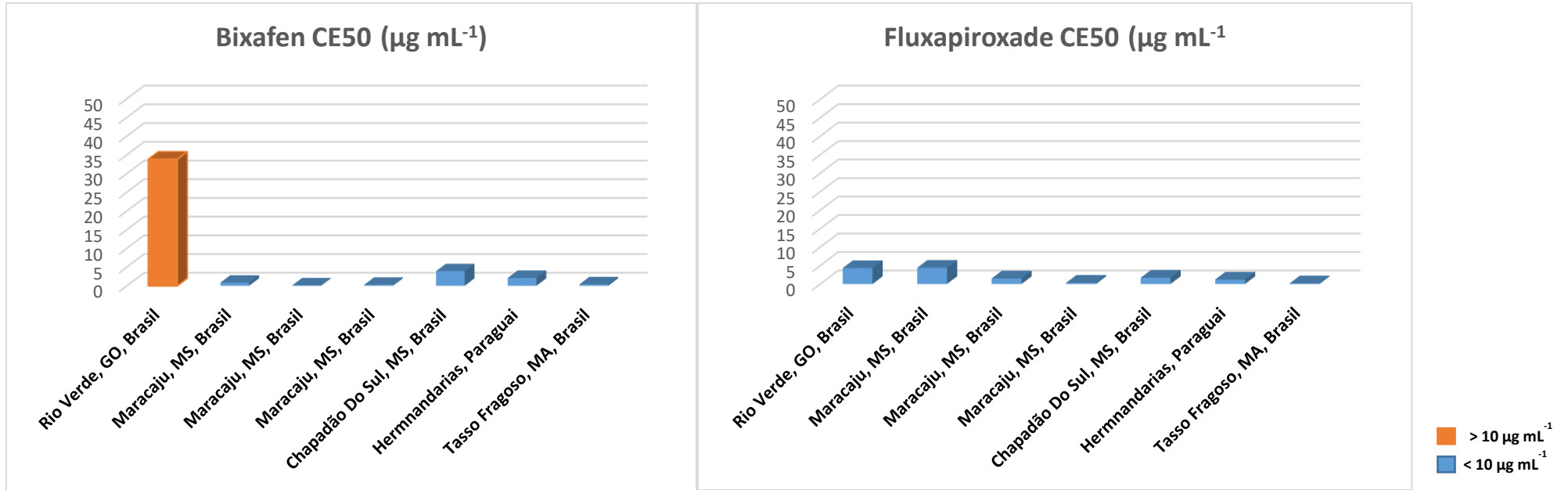


Figura 5.3. Resultado da concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxapiroxade nos estados do MS, GO, MA e no Paraguai.

5.2 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

Dos 55 isolados avaliados pelo método de microtitulação colorimétrica, 20 foram selecionados de acordo com a sua classificação sendo 6 altamente resistente, 7 moderadamente resistentes e 7 sensíveis para o bixafen e 6 altamente resistente, 4 moderadamente resistente e 10 sensíveis para fluxapiroxade (Tabela 5.2).

O valor da CE50, pelo método inibição de crescimento micelial, para o isolado de referência CMES 313 (Nova Mutum, MT, 1998) foi abaixo do valor da primeira dose (<0,5), ou seja considera-se extremamente sensível aos dois produtos (bixafen e fluxapiroxade), respectivamente (Tabela 5.2). Esse mesmo isolado foi utilizado como referência por Teramoto et al., (2017) sendo obtido valor de $CE50 < 0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$ para fluxapiroxade (menor dose avaliada), utilizando o método de inibição de crescimento micelial em meio de cultura BDA com fungicida.

Para o bixafen, os valores da CE50 variaram de <0,5 (primeira dose) a $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. O isolado com maior valor foi o CMES 1736 (Tangará da Serra, MT), isolado em 2016 (Tabela 5.2). Treze isolados (CMES 2014, 313, 2084, 1474, 2016, 2038, 2047, 2025, 2017, 2012, 2086, 2029, 2007 2041) apresentaram $CE50 \leq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e sete apresentaram valores de $CE50 > 1$ e $\leq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para bixafen (CMES 2004, 2005, 2041, 2032, 2035, 2031, 1736).

Para fluxapiroxade a maioria dos isolados obtiveram valores de CE50 abaixo da primeira dose do produto testado (<0,5) (Figura 5.4) apenas dois dos isolados (CMES 2031 e 2035), ambos de Deciolândia, MT, apresentaram valores acima de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo (CMES 2031 - $1,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 2035 - $1,30 \mu\text{g mL}^{-1}$). Todos os valores foram inferiores ao maior valor observado por Teramoto et al. (2017) ($1,76 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizando o método inibição de crescimento micelial em BDA. O uso de fluxapiroxade em soja iniciou na safra 2013/14 e desta forma, os 20 isolados selecionados podem ser considerados sensíveis a fluxapiroxade por essa metodologia.

Para os isolados CMES 1474, 2012, 2014, 2038 e 2086, não foi possível estimar a CE50 do método inibição de crescimento micelial, quando submetidos ao produto fluxapiroxade, devido ao seu valor não ser conclusivo com base nos modelos estatísticos utilizados para estimar a CE50. O diagrama mostrou altas variações aleatórias nas respostas para doses maiores que zero. Sendo difícil afirmar que isso indicaria sensibilidade, porque a diferença em relação ao zero foi significativa.

Na concentração de 32 e 64 ppm, doses máximas, para os fungicidas bixafen e fluxapiroxade, não houve crescimento micelial de nenhum dos 20 isolados de *C. cassicola* testados.

Tabela 5.2. Concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (CE50 – $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bixafen e fluxapiroxade comparando o método de microtitulação colorimétrica e o Índice de crescimento micelial.

Isolado CMES	bixafen		fluxapiroxade	
	CE50 Crescimento micelial	CE50 Microtitulação colorimétrica	CE50 Crescimento micelial	CE50 Microtitulação colorimétrica
313	<0,5	0,02	<0,5	0,69
1474	<0,5	3,70	NE	5,70
1736	4,00	15,80	<0,5	22,50
2004	1,10	4,10	<0,5	0,79
2005	1,50	0,79	<0,5	14,00
2007	1,00	0,82	<0,5	2,30
2012	0,77	3,30	NE	0,42
2014	<0,5	24,10	NE	21,70
2016	<0,5	1,20	<0,5	1,40
2017	0,57	0,03	<0,5	8,30
2025	0,56	1,30	<0,5	1,10
2029	0,99	21,7	<0,5	23,30
2031	3,50	30,8	1,10	25,90
2032	1,80	8,60	<0,5	20,60
2035	2,50	30,2	1,30	30,10
2038	<0,5	0,20	NE	0,58
2041	1,50	37,80	<0,5	11,80
2047	0,56	0,92	<0,5	0,42
2084	<0,5	1,00	<0,5	0,99
2086	0,84	0,39	NE	0,18

*NE- não estimado.

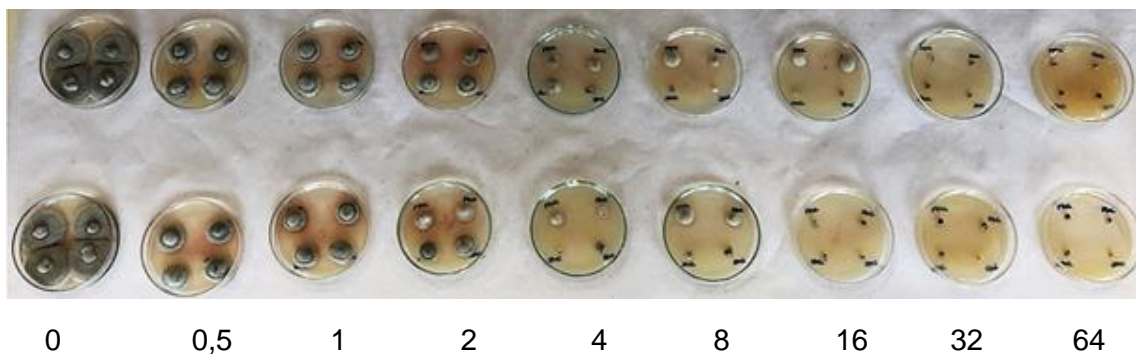


Figura 5.4. Inibição de crescimento micelial em meio de cultura em diferentes doses de fungicidas.

5.3 RELAÇÃO DOS MÉTODOS MICROTITULAÇÃO COLORIMÉTRICA x INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL.

Os resultados de CE50 obtidos pelo método de microtitulação colorimétrica foram relacionados com os valores obtidos por inibição de crescimento micelial. As correlações entre os métodos foram de $r=0,58$ ($p=0,42$) para bixafen e $r=0,72$ ($p=0,002$) para fluxapiraxade.

Isolados classificados como resistentes e moderadamente resistentes pela microtitulação colorimétrica, pelo método de inibição de crescimento micelial foram classificados como sensíveis.

Utilizando o método de inibição de crescimento micelial, os valores de CE50 foram inferiores aos valores obtidos pelo método de microtitulação colorimétrica.

O método de microtitulação colorimétrica vem sendo recomendado pelo FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) para medir a sensibilidade de patógenos a diferentes grupos de fungicidas (VEGA et al., 2012; RAMPERSAD, 2011; STAMMLER et al., 2007; STAMMLER; SPEAKMAN, 2006) por apresentar baixo custo, em razão da menor quantidade de material utilizado e também apresentar redução significativa da quantidade fungicida nos experimentos, em comparação com o método de inibição de crescimento micelial. A baixa correlação observada nesse estudo, principalmente para isolados classificados com resistentes e altamente resistentes, não permite inferir que esse método possa ser utilizado como precisão para os ISDH avaliados.

Diferentes hipóteses são levantadas para as variações entre os métodos. Uma das hipóteses é a ocorrência de variação entre os isolados, uma vez que os experimentos não foram conduzidos simultaneamente, sendo necessário fazer repetições, onde se faz necessário repicar várias vezes o mesmo isolado. Os isolados utilizados neste trabalho não foram monospóricos. O fungo *C. cassiicola* possui alta variabilidade. MIYAMOTO et al. (2009) nos experimentos com avaliação de resistência a *C. cassiicola* utilizou isolados monospóricos ou a partir de micélio único, porém Mello (2019) não observou relação dos métodos de microtitulação colorimétrica e análise molecular dos isolados a partir de cultura monospórica.

Outra variação que pode ocorrer na microtitulação é diferença na quantidade de esporos dentro dos poços das microplacas, em razão pequena unidade amostral. A uniformização da concentração de inóculo foi realizada com auxílio de hematocítmetro, porém observou-se variação nas leituras entre repetições e doses,

podendo ser atribuída a diferente quantidade de esporos do fungo depositados nos poços ou mesmo contaminação.

Em um estudo feito por Raposo et al., (2015) aplicando o método de microtitulação colorimétrica observou que alguns parâmetros deste método apresentam influência na relação entre a biomassa fúngica e absorção, incluindo o volume total da cultura no poço. Os autores concluíram que, os valores obtidos para CE50 pelo método ICM e pelo método de microtitulação colorimétrica apresentam correlação positiva.

No estudo realizado por Raposo et al., (2015) foram observados valores menores de CE50, obtidos pelo método de microtitulação colorimétrica em relação ao método de ICM, de forma oposta ao realizado nesse estudo. Os autores atribuem os valores menores ao fato do método de microtitulação utilizar 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.

A fonte de carbono do meio de cultura utilizado pode também influenciar nos estudos de sensibilidade. Testes de crescimento em meio YBA para carboxina, um fungicida ISDH, mostraram aumento de 10x na toxicidade quando o acetato substituiu a glicose como fonte de carbono (RAGSDALE; SISLER,1970). De forma semelhante, o crescimento micelial de Isolados de *C. cassiicola* foram quase inibidos no meio YBA adicionado com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de boscalida (ISDH), enquanto os isolados não foram inibidos no BDA adicionado com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do mesmo fungicida (MIYAMOTO et al., 2009).

De forma semelhante a MIYAMOTO et al. (2009), MacKenzie (2017) avaliando a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* a ISDH em meio de cultura YBA e BDA observou que isolados identificados como resistentes a boscalida em BDA ($> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram valores de CE50 muito mais baixos em YBA, variando de 2,52 a $27,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($14,2 \pm 10,1 \mu\text{g mL}^{-1}$). O mesmo autor observou na análise de dez isolados uma forte correlação de Pearson entre os valores da CE50 obtidos a partir dos meios de cultura YBA e BDA para os fungicidas pentiopirade ($r = 0,76$, $p = 0,011$), benzovindiflupir ($r = 0,856$, $p = 0,002$) e fluopiran ($r = 0,965$, $p \leq 0,0001$). Fluxaproxade teve uma correlação mais fraca de Pearson ($r = 0,683$, $p = 0,0295$), embora as matrizes de correlação de Spearman entre os valores tenham sido altamente correlacionadas para fluxaproxade ($\rho = 0,927$, $p \leq 0,0001$). MacKenzie (2017) concluiu que a

sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* pode ser distinguidos em qualquer tipo de meio e realizou o experimento de inibição utilizando BDA.

No experimento realizado neste trabalho, utilizou-se dois meios de culturas distintos, YBA em microplacas e BDA na inibição de crescimento micelial, o que pode explicar a diferença das CE50 observadas. O meio de cultura BDA, para os ativos avaliados, mostrou maior inibição que o meio YBA nas microplacas.

Os monitoramentos realizados pelo FRAC (BASF e Syngenta) utilizam a metodologia de microplacas, populações do fungo e meio de cultura YBA (informação pessoal). Por meio dos resultados dos monitoramentos realizados pelo FRAC, isolados de *C. cassiicola* de soja com sensibilidade reduzida para os fungicidas ISDH foram encontrados em populações na safra 2017/2018 (FRAC, 2018). As mutações *sdhB*-H278Y e *sdhC*-N75S que conferem menor sensibilidade do fungo a fungicidas ISDH foram relatadas pelo FRAC em 2018.

Todos os resultados publicados com monitoramento de *C. cassiicola* a fungicidas ISDH utilizam o método inibição de crescimento micelial (BDA ou YBA) (MIYAMOTO et al., 2009; ISHII et al., 2010; TERAMOTO et al., 2017; MACKENZIE, 2017).

Os 20 isolados selecionados foram enviados para sequenciamento de nova geração, das subunidades *sdhB*, C e D. As sequências geradas serão alinhadas e comparadas em programas com bancos de dados de sequências já estabelecidas, para identificação das mutações em relação à sensibilidade aos fungicidas. Os resultados do sequenciamento poderão auxiliar na avaliação dos resultados dos métodos de microtitulação e de inibição de crescimento micelial.

CONCLUSÃO

Os valores obtidos para CE50 utilizando a metodologia de microtitulação colorimétrica indicou a ocorrência de isolados de *Corynespora cassiicola* com menor sensibilidade aos fungicidas bixafen e fluxapiraxade, porém, os mesmos isolados foram sensíveis utilizando a metodologia de inibição de crescimento micelial.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons/>. Acesso em: 27/10/2019.
- 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, p. 111-112, 1976.
- ALMEIDA, A. M. R.; SARAIVA, O. F.; FARIAS, J. R. B.; GAUDÊNCIO, C. A. L.; TORRES, E. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 36, p. 1231–8, 2001.
- AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. Committee of Standardization of Fungicidal Tests. Test tube dilution technique for use with the slide-germination method of evaluating protective fungicides. **Phytopathology**, v. 37, p. 354-356, 1947.
- AVENOT, H.; MICHAILIDES, T. J. 2008. **Monitoring the Sensitivity to Boscalid of *Alternaria alternata* Populations from California Pistachio Orchards**. California Pistachio Industry Reports, Fresno, CA, Crop Year. 5 pp, 2008.
- AVENOT, H; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine (pyraclostrobin + boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California. **Plant Pathology** 57, 135– 40, 2008.
- AVOZANI, A. Sensibilidade de *Corynespora cassiicola*, isolados da soja, a fungicidas *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.
- AVOZANI, A; REIS, E. M; TONINA, R. B. Perda de sensibilidade de *Corynespora cassiicola* isolada da soja, ao fungicida carbendazim. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 2, p. 273-276, 2014.
- BANDYOPADHYAY, R.; OJIAMBO, P. S.; TWIZEYIMANA, M.; ASAFO-ADJEI, B.; FREDERICK, R. D.; PEDLEY, K. F.; STONE, C. L.; HARTMAN, G. L. First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Ghana. **Plant Disease**, v. 91, n. 8, p. 1057, 2007.
- BARTHE, P.; PUJADE-RENAUD, V.; BRETON, F.; GARGANI, D.; THAI, R.; ROUMESTAND, C.; DE LAMOTTE, F. Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. **Journal of Molecular Biology**, 367(1), 89–101, 2007.
- BECKON, W.N.; PARKINS, C.; MAXIMOVICH, A.; BECKON, A.V. A General Approach to Modeling biphasic relationships. **Environmental Science & Technology** 42:1308 – 1314. 2008.

- BEDENDO, L.P. Ambiente e doença. *In*: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. Agronomia Ceres. São Paulo. vol.1. p.331-341,1995.
- BELUFI, L.M.R.; PITTELKOW, F.K.; PASQUALLI, R.M. Avaliação da eficiência de programas de fungicidas para o controle de doenças na cultura da soja em duas épocas de semeadura no Mato Grosso. *Boletim Técnico Safra 2014/15*. Fundação de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Rio Verde. Versão on-line, 13 p, 2015.
- BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Universidade Federal Viçosa. 817 p. 1999.
- BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiol Lett** 69, 55–59, 1990.
- BURDON, J. J.; MARSHALL, D. R. Evaluation of Australian native species of *Glycine* for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, v. 65, p. 44-45, 1981.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2018/2019, **Sétimo levantamento**, Brasília, v.5. p.1-129, 2019.
- DEKKER, J. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. *In*: Lyr H, (Ed.) Modern selective fungicides. Properties, applications and mechanism of action. New York, US. **Longman Scientific & Technical** pp. 39-52
- DÉON, M.; FUMANAL, B.; GIMENEZ, S.; BIEYSSE, D.; OLIVEIRA, R. R.; SHUIB, S. S.; et al. (2014). Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. **Fungal Biology**, 118(1), 32–47, 1987.
- DIXON, L. J.; SCHLUB, R. L.; PERNEZNY, K.; DATNOFF, L. E. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, 99 (9), p.1015–1027, 2009.
- EDGINGTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42- 44, 1971.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungal databases**, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. 2018. Disponível em: < <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 09/06/2019.
- FRAC- FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE – Brasil. FRAC Code List. **Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering)**. 2016. Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/fraccode-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4>>. Acesso em 02/11/2019.
- FRAC- FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - Brasil. **Informação preliminar sobre carboxamidas para mancha-alvo**. 2019. Holambra, SP. Disponível em:

<https://docs.wixstatic.com/ugd/85b1d3_75c39b4ea047493bb3614c807ce38266.pdf>. Acesso em: 09/07/2019.

FRAC- FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - Brasil. **Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) Working Group**. 2018. Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sdhi-meeting-minutes/minutes-of-the-2017-sdhi-meeting-telecon-28-03-2018-recommendations-for-2018.pdf?sfvrsn=e4684b9a_2>. Acesso em: 22/09/19.

GALBIERI, R.; ARAÚJO, D.C.E.B., KOBAYASTI, L.; GIROTTO, L.; MATOS, J.N.; MARANGONI, M.S.; ALMEIDA, W.P.; MEHTA, Y.R. *Corynespora* leaf blight of cotton in Brazil and its management. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 3805-3811, 2014.

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

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas**. Jagariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 78 p, 2000.

GODOY, C. V.; MEYER, M. C. Resistência a fungicidas na cultura da soja. Embrapa Soja-Artigo em periódico. 2014 Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108972/1/Resist-encia-a-fu-ngici-das-na.pdf>>. Acesso em:08/07/2019.

GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M.; MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; PIMENTA, C.B.; FILHO, D.S.J. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2013/14: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 7p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 104, 2014.

GODOY, C. V.; UTIMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D; PIMENTA, C. B.; MIGUEL-WRUCK, D. S. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular técnica**. Londrina, PR, 2017.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; PIMENTA, C. B.; MIGUEL-WRUCK, D. S.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; ARAUJO JUNIOR, I. P.; GRIGOLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; BELUFI, L. M.; SILVA, L. H. C. P.; VOLF, M. R.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M. C.; DEBORTOLLI, M. P.; CARLIN, V. J.; BALARDIN, R. S. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2015/16: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja; (Paraná Circular Técnica 120), 2016.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; DIAS, W. P. Manual de identificação de doenças de soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2005.

ISHII, H.; MIYAMOTO, T.; USHIOD, S.; KAKISHIMAB, M. Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podospaera xanthii*. *Pest. Management. Science*. 67:474-482, 2010.

ISHII, H.; NISHIMURA, K. Boscalid sensitivity of strobilurin resistant fungal isolates. In: **32 nd Annual Meeting of Pesticide Science Society of Japan**, v. 32, 207 p, 2007.

JUSTUM A.R.; HEANEY S.P.; PERRIN B.M.; WEGE P.J. Pesticide resistance: assessment of risk and implementation of effective management strategies. **Pesticide Science**. v. 54, p. 435–46, 1998.

LEROUX, P.; WALKER, A.S.; SENECHAL, Y. **Etude de la sensibilité de *Botrytis cinerea* au boscalid**. In: 7th International Conference on Plant Diseases (cdROM; www.afpp.net). AFPP, Paris, France, 2003.

LI, X.; ENGELBRECHT, C. J.; MUELLER, D. S.; YANG, X. B. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Iowa and its state wide occurrence. **Plant Disease**, v. 92, n. 6, p. 975, 2008.

LOOMIS, T. A. **Fundamentos de toxicologia**. 3. Ed. Zaragoza:Acribia, 1995.

LU, Y.; MA, J.; SUTTON, T.B.; YPEMA, H. Comparison of two assay methods for evaluating the sensitivity of *Alternaria mali* to boscalid. **Phytopathology** 94, S63, 2004.

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.

MACKENZIE, K. J. **Target spot of tomato in Florida: a current review and statewide characterization of respiration inhibitor fungicide sensitivity**. Thesis of Master of Science. University of Florida.107 p, 2017.

MCGRATH, M. T. Fungicide sensitivity in *Podosphaera xanthii* and efficacy for cucurbit powdery mildew in NY, USA. In 2003 e 2006. **Journal Plant Pathology**. 90 (2, Suppl.), S2.90, 2008.

MCGRATH, M. T. **What are fungicides?** The Plant Health Instructor. Cornell University, 2004. Disponível em: <<http://www.apsnet.org>>. Acesso em: 20/07/2019.

MELLO, F. E. **Variabilidade genética e sensibilidade de *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola* a fungicidas**. 232 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

MELO, M. M. DE.; REIS, E. M. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* em soja, limiares térmicos e temperatura ótima para a germinação de conídios em meio de cultura. **Summa phytopathology**. Botucatu, v. 36, n. 3, p. 254-256, 2009.

MEYER, M.; GODOY, C.; VENANCIO, W.; TERAMOTO, A. Manejo equilibrado. **Revista Cultivar**, v.165, p.03-07, 2013.

MIAZZI, M.; MCGRATH, M. T. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to registered fungicides and experimentals in GA and NY, USA. In2007. **Journal Plant Pathology**. 90(2, Suppl.), S2.90, 2008.

MIYAMOTO, T.; ISHII, H.; SEKO T.; KOBORIS, T. Y. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. **Plant Pathology** 58:1144–1151, 2009.

MOLINA, J.P.; PAUL, P. A.; AMORIM, L.; SIQUERI, E. P.; VENANCIO, W. S.; MARTINS, M. C.; GODOY, C. V. Effect of target spot on soybean yield and factors affecting this relationship. **Plant Pathology**, n. 68, p. 107-155, 2019.

MYRESIOTIS, C. K.; BARDAS, G. A.; KARAOGLANIDIS, G. S. Base line sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine - and benzimidazole-resistants strains by these fungicides. **Plant Dis.** 92, p.1427 -1431, 2008.

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

OLIVEIRA, R. R.; AGUIAR, B. D. M.; TESSMANN, D. J.; PUJADE-RENAUD, V. VIDA J. B. Chlamyospore formation by *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**. v. 37, p. 415-8, 2012.

RAGSDALE N. N.; SISLER H. D. Metabolic effects related to fungitoxicity of carboxin. **Phytopathology** v.60, p.1422–1427, 1970.

RAMPERSAD, S. N. A rapid colorimetric microtiter *Verticillium dahliae* isolates. **Plant Disease**. 95, 248–255, 2011.

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

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, 226 p, 2010.

RUSSEL, P. E. **Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management**. Brussels, Belgium: Crop Life International: FRAC Monograph 3, 2004.

SCHOCH, C. L.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; BOEHM, E. W. A.; BURGESS, T. I.; DE GRUYTER, J. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. **Studies in Mycology**, 64, 1-15, 2009.

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

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

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**, Collingwood, v. 43, n. 6, p. 609-618, 1995.

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

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.

SOUSA, F. M. G.; BENTES, J. L. S. Variabilidade de uso de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei procedentes do Amazonas, em meios de cultura. **Summa phytopathology**. v.40, n.1, pp.84-87, 2014.

SOUZA, A. F.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; MENDES, C.; FREITAS, R L.; ZAMBOLIM, E. M., JR.; JESUS, W. C.; PEREIRA, O. L. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v.4, p.72-74, 2009.

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.

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

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: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

TERAMOTO, A.; MEYER, M. C.; SUASSUNA, N. D.; CUNHA, M. G. Sensibilidade *in vitro* de *Corynespora cassiicola* isolada de soja a fungicidas e controle químico de campo da mancha-alvo. **Summa phytopathology**, Botucatu, v. 43, n. 4, p. 281-289, 2017.

TERAMOTO, A.; SALVAIA, A.; MARTINS, M.C. **Sensibilidade in vitro de *Corynespora cassiicola* obtidos de diversas culturas a fungicidas**. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 28, 2005, São Paulo. Resumos... Botucatu, GPF, 39 p, 2005.

TORGESON, D. C. Determination and measurement of fungitoxicity. In:TORGESON, D. C. **Fungicides: an advanced treatise**, New York: Academic Press, v. 1, 742 p, 1967.

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P. S.; IKOTUN, T.; PAUL, C.; HARTMAN, G. L.; BANDYOPADHYA, Y. R. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaf

evaluations of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v. 91, n. 9, p.1161-1169, 2007.

USHIO, S.; TAKEUCHI, T. Sensitivity of the pathogen for *Corynespora* target leaf spot of cucumber in Chiba Prefecture to boscalid (in Japanese). **Ann Res Bull Chiba Pref Agric Forest Res Centr** 1:47–50, 2009.

VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, P.F.; DEWDNEY, M. M. A rapid resazurin based microtiter assay to evaluate QoI sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. **Plant disease** 96: 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** 38, 431–5, 2013.

YANASE, Y.; YOSHIKAWA, Y.; KISHI, J.; KATSUTA, H. **The history of complex II inhibitors and the Discovery of penthiopyrad**. In:Ohkawa, H., Miyagawa,H., Lee, P. W.(Eds.),PesticideChemistry.Crop Protection,Public Health, Environmental Safety.WILEY-VCH, Weinheim, Germany,pp.295-303, 2007.

YEH, C. C. Physiological races of *Phakopsora pachyrhizi* in Taiwan. **Journal Agricultural Research**. China, v. 32, n. 1, p. 69-74, 1983. Disponível em: <http://www.tari.gov.tw/taric/uploads/journal_arc_32-1-7.pdf>. Acesso em: 02/11/2019.

YORINORI, J. T. Management of Foliar Fungal Diseases in Soybean in Brazil. In: Copping LG, Grenn MB, Rees RT, eds. **Pest Management in Soybean**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Ltd, 185–95, 1992.

ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de prépenetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p.156-160, 2007.

ZHANG, C.Q.; LIU, Y.H.; MA, X.Y.; FENG, Z.; MA, Z.H. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. **Crop Protection**. v.28, p. 381-386, 2009.

ZHANG, C.Q.; YUAN, S.K.; SUN, H.Y.; QI, Z.Q.; ZHOU, M.G.; Zhu, G.N. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. **Plant Pathology**. v.56, p.646-653, 2007.