



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SHEILA ARIANA XAVIER

**SENSIBILIDADE DOS FUNGOS *PHAKOPSORA*
PACHYRHIZI E *CORYNESPORA CASSIICOLA* A
FUNGICIDAS**

SHEILA ARIANA XAVIER

**SENSIBILIDADE DOS FUNGOS *PHAKOPSORA*
PACHYRHIZI E *CORYNESPORA CASSIICOLA* A
FUNGICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

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

Co- Orientador(a): Prof. Dr. Maria Isabel Balbi Peña

Londrina
2013

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

X3s Xavier, Sheila Ariana.
Sensibilidade dos fungos *Phakopsora pachyrhizi* e *Corynespora cassiicola* a fungicidas / Sheila Ariana Xavier. – Londrina, 2013.
80 f. : il.

Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri.
Co-orientador: Maria Isabel Balbi Peña.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Ferrugem asiática – Teses. 2. Ferrugem da soja (Doença) – Teses. 3. Fungicidas – Toxicidade – Teses. 4. Soja – Doenças e pragas – Teses. I. Canteri, Marcelo Giovanetti. II. Balbi Peña, Maria Isabel. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 632.952

SHEILA ARIANA XAVIER

**SENSIBILIDADE DOS FUNGOS *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* E
CORYNESPORA CASSIICOLA A FUNGICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Isabel Balbi Peña
UEL – Londrina – PR

Dr. Rafael Moreira Soares
EMBRAPA – Londrina - PR

Dra. Claudine Dinali Santos Seixas
EMBRAPA – Londrina - PR

Dr. Álvaro Manuel Rodrigues Almeida
EMBRAPA – Londrina - PR

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago
UEL – Londrina - PR

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Balbi
Peña
UEL – Londrina – PR

Londrina, 18/02/2013

DEDICO

Ao meu filho Miguel, que me faz ter vontade de dar o melhor de mim em tudo o que faço e ao meu marido e companheiro incondicional Wanderson. Vocês são a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu pai Silvio, por ser um exemplo de caráter, pessoa amorosa, esforçada, que mesmo diante de tantas lutas se faz presente em todos os momentos e sempre põe a família em primeiro lugar. A minha mãe Ivanilda pelo grande incentivo e pela imensa ajuda em cuidar do meu filho pra eu poder continuar a estudar e realizar meus sonhos acadêmicos.

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

Ao meu filho Miguel, que é a coisa mais linda que já aconteceu na minha vida, minha fortaleza, meu verdadeiro amor, meu maior incentivo de dar o melhor de mim em tudo que faço, pois sei que serei seu exemplo na vida.

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

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

A minha co-orientadora Maria Isabel Balbi Peña, por toda a ajuda, pela dedicação, confiança, alegria em ajudar e pelas ótimas correções e sugestões.

A amiga Daiane, por me acompanhar e me ajudar durante toda a vida acadêmica, pelo companherismo, esforço em ajudar, motivação e carinho.

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

Aos amigos de estágio, Allan, Flávia e Dalton, pelo companheirismo e animação em todos os momentos, pelo comprometimento com os trabalhos e pela imensa ajuda que fez tornar tudo mais fácil. A amiga de sempre, Josiane, que está sempre ao meu lado, fazendo parte de todos os momentos importantes de minha vida, pelas conversas, desabafos, conselhos e especialmente pela amizade sincera.

E em especial a Deus que sempre está ao meu lado e permitiu a realização de mais um sonho... “Os sonhos de Deus são maiores que os meus, Ele vai fazer o melhor por mim, Ele vai além do que eu posso ver, Ele faz o que eu não posso fazer, Deus vai cumprir os seus planos em mim, Ele vai fazer o que Lhe apraz, sou pequeno e falho, mas Ele é Deus, Ele só faz o melhor pelos seus”.

EPÍGRAFE

Porque eu bem sei os pensamentos que tenho a vosso respeito, diz o SENHOR; pensamentos de paz, e não de mal, para vos dar o fim que esperais. Jeremias 29:11.

XAVIER, Sheila Ariana. **Sensibilidade dos fungos *Phakopsora pachyrhizi* e *Corynespora cassiicola* a fungicidas**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi determinar a DL50 para o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem-asiática da soja, em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil na safra 2010/11 e 2011/12, dos fungicidas tebuconazol, ciproconazol, metconazol e protioconazol, e comparar a DL50 para isolados de *Corynespora cassiicola* depositados na micoteca da Embrapa soja, coletados em diferentes anos e locais, com a DL50 para os isolados da safra 2010/11, dos fungicidas carbendazim e protioconazol. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo os tratamentos definidos em função das diferentes doses dos fungicidas utilizados. Para *P. pachyrhizi* foi utilizada a metodologia *in vivo* com folíolos destacados e inoculados. Aos 14 dias após inoculação foram realizadas as avaliações de severidade. Para *C. cassiicola* foi utilizada a metodologia *in vitro* com medições de crescimento micelial realizadas aos dez dias após a repicagem do fungo. As médias das DL50s para *P. pachyrhizi* foram 0,33 ppm e 1,08 ppm para tebuconazol; 0,58 ppm e 3,31 ppm para ciproconazol; 0,37 ppm e 1,39 ppm para metconazol; 0,10 ppm e 0,13 ppm para protioconazol, respectivamente para safra 2010/11 e 2011/12. Para *C. cassiicola* as médias das DL50s foram 5,03 ppm para protioconazol e 72,79 ppm para o carbendazim. Conclui-se que dos quatro triazóis testados para controle da ferrugem-asiática da soja, o protioconazol apresentou menores valores da DL50, sendo as populações de *P. pachyrhizi* sensíveis a esse produto, e os valores obtidos da DL50 no ensaio com *C. cassiicola* sugerem a seleção de isolados resistentes a benzimidazóis ao longo do tempo e redução da sensibilidade ao protioconazol.

Palavras-chave Ferrugem-asiática. Mancha-alvo. DL50.

XAVIER, Sheila Ariana. **Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* and *Corynespora cassiicola* to fungicides**. 2013. 80 p. Master Thesis in Agronomy – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the LD50 for the fungus *Phakopsora pachyrhizi* that causes Asian soybean rust, in different regions of soybean production in Brazil in 2010/11 and 2011/12 crop, of the fungicides tebuconazole, cyproconazole, metconazole and prothioconazole, and determine the LD50 for isolates of *Corynespora cassiicola* deposited in mycology collection at Embrapa Soybean, collected in different years and locations, and isolated in 2010/11 crop, of the fungicides carbendazim and prothioconazole. The experimental design was completely randomized with four replications; the treatments were defined according to different fungicides dosis used. For *P. pachyrhizi* was used the *in vivo* detached leaf method. Severity was estimated at 14 days post-inoculation. For *C. cassiicola* was used as methodology *in vitro* with mycelial growth measurements performed at ten days after the inoculation with the fungus. The LD50s mean for *P. pachyrhizi* were 0,33 ppm and 1,08 ppm of tebuconazole; 0,58 ppm and 3,31 ppm of cyproconazole; 0,37 ppm and 1,39 ppm of metconazole; 0,10 ppm and 0,13 ppm for prothioconazole, respectively for the crop 2010/11 and 2011/12. For *C. cassiicola* the LD50s mean were 5,03 ppm of prothioconazole and 72,79 ppm of carbendazim. We conclude that the four triazoles tested for control of Asian soybean rust, the prothioconazole showed lower values of LD50, being the populations of *P. pachyrhizi* sensitive to this product, and the LD50 obtained for *C. cassiicola* suggest the selection of isolates resistant to benzimidazoles over time and reduced sensitivity to prothioconazole.

Key-words Asian soybean rust. Target-spot. LD50.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Distribuição dos valores da DL50 e seus respectivos limites inferior e superior de sensibilidade ao tebuconazol (A), ciproconazol (B), metconazol (C), protioconazol (D) das populações de campo de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> de várias regiões produtoras de soja no Brasil, safra 2010/11	42
Figura 3.2	Distribuição dos valores da DL50 e seus respectivos limites inferior e superior de sensibilidade ao tebuconazol (A), ciproconazol (B), metconazol (C), protioconazol (D) das populações de campo de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> de várias regiões produtoras de soja no Brasil, safra 2011/12	43
Figura 3.3	Monitoramento da sensibilidade de populações de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> aos triazóis tebuconazol (A), ciproconazol (B), metconazol (C), protioconazol (D) nas safras 200/09, 2009/10, 2010/11 e 2011/12.....	45
Figura 4.1	Distribuição dos valores da DL50 e seus respectivos limites inferior e superior de sensibilidade ao protioconazol (A) e ao carbendazim (B) dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> de várias regiões produtoras de soja no Brasil.....	59
Figura 4.2	Crescimento micelial de <i>Corynespora cassiicola</i> - Isolado MES 311, coletado em 1997, em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida protioconazol	60
Figura 4.3	Crescimento micelial de <i>Corynespora cassiicola</i> - Isolado MES 318, coletado em 1999, em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida carbendazim.....	61
Figura 4.4	Crescimento micelial de <i>Corynespora cassiicola</i> - Isolado MES 931, coletado em 2011, em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida carbendazim.....	61
Figura 4.5	Distribuição dos valores da DL50, dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> da soja de estados brasileiros em diferentes anos de coleta, submetidos ao protioconazol (A) e ao carbendazim (B).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Quantidade de amostras recebidas por Estado, tempo decorrido da coleta ao recebimento, concentração da suspensão de esporos, germinação e severidade máxima nas safras 2010/11 e 2011/12.....	41
Tabela 4.1 Identificação, local de origem e ano de coleta dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i>	54
Tabela 4.2 Porcentagem de inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> de 25 isolados de <i>Corynespora cassicola</i> obtidos de soja, submetidos aos fungicidas protioconazol (Prot.) e carbendazim (Carb.) na concentração de 0, 5, 1, 10, 100 e 1000 ppm	57
Tabela 4.3 Isolados e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida protioconazol e carbendazim	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 IMPORTÂNCIA DA SOJA.....	15
2.2 FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA.....	15
2.2.1 Histórico da Ferrugem-asiática.....	16
2.2.2 Ciclo Biológico Da Doença.....	17
2.2.3 Sintomatologia.....	19
2.2.4 Condições Ambientais Favoráveis	20
2.2.5 Danos.....	21
2.2.6 Controle Químico	22
2.3 MANCHA-ALVO.....	23
2.3.1 Histórico Da Mancha-alvo	25
2.3.2 Ciclo Biológico Da Doença.....	26
2.3.3 Sintomatologia.....	27
2.3.4 Condições Ambientais Favoráveis	28
2.3.5 Danos.....	28
2.3.6 Controle Químico	28
2.4 FUNGITOXICIDADE E SENSIBILIDADE DE PATÓGENOS	29
2.4.1 Métodos Utilizados Para Avaliação De Fungitoxicidade De Um Fungicida.....	31
2.4.2 Testes <i>In Vivo</i>	31
2.4.3 Testes <i>In Vitro</i>	32
2.4.4 Avaliação Dos Resultados	34
3 ARTIGO A: SENSIBILIDADE DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i> A FUNGICIDAS DO GRUPO DOS TRIAZÓIS <i>IN VIVO</i> NA SAFRA 2010/11 E 2011/12	35
3.1 RESUMO E ABSTRACT	35
3.2 INTRODUÇÃO.....	37
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

3.5 CONCLUSÃO	49
4 ARTIGO B: SENSIBILIDADE DE <i>Corynespora cassicola</i> AO FUNGICIDAS CARBENDAZIM E PROTIOCONAZOL <i>IN</i> VITRO	50
4.1 RESUMO E ABSTRACT	50
4.2 INTRODUÇÃO.....	52
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.5 CONCLUSÃO	67
5 CONCLUSÕES GERAIS	68
6 REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

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

A soja é largamente cultivada no Brasil graças a sua adaptação, alta produtividade, fácil manejo, condições favoráveis ao cultivo e facilidade de mecanização, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial de soja.

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja, encontram-se as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil (TECNOLOGIAS, 2011).

Atualmente, a principal doença da soja é a ferrugem-asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd, que pode causar perdas severas na produção quando ocorrem condições ideais para seu desenvolvimento. Danos em decorrência da doença têm variado de 10% a 91% e estão relacionados à desfolha prematura e a redução do ciclo da cultura, o que impede a plena formação dos grãos (SINCLAIR; HARTMAN, 1999). Para reduzir os riscos de danos à cultura pela ferrugem-asiática, no Brasil, as estratégias recomendadas no manejo da doença são: a utilização de cultivares de ciclo precoce, com semeadura no início da época recomendada; a ausência de cultivos de soja na entressafra, incluindo a eliminação de plantas de soja voluntárias, por meio do vazio sanitário; o monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura, com a utilização de fungicida no aparecimento dos primeiros sintomas ou, preventivamente, quando a doença já estiver presente na região e a utilização de cultivares resistentes, quando disponíveis (TECNOLOGIAS, 2011).

Uma doença da soja que vem se destacando nos últimos anos é a mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & M. A. Curt) C. T. Wei, que ocorre em caráter epidêmico em todas as áreas produtoras, tendo maior importância no cerrado brasileiro. O uso de cultivares resistentes é a primeira medida para o controle da mancha-alvo na cultura da soja, seguido por tratamento de sementes, rotação de culturas e controle com fungicida (ALMEIDA et al., 2005).

Com relação ao controle químico, inúmeros trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos de maneira a determinar, principalmente em condições de campo, a eficácia de diferentes princípios ativos de fungicidas, momentos de aplicação (em relação ao ciclo de desenvolvimento da cultura), tecnologias de aplicação e efeito residual. Uma importante contribuição, neste sentido, refere-se a informações sobre a fungitoxicidade das substâncias químicas.

Parâmetros como a DL50 (dose letal do fungicida para controlar 50% da população em estudo) definem a fungitoxicidade de uma substância química (SHARVELLE 1961; EDGINGTON; KHEW; BARRON, 1971; LOOMIS, 1995; SILVA et al., 2006). Valores da DL50, para diferentes fungicidas e específicos para *P. pachyrhizi* e *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. A sensibilidade *in vitro* de isolados de *C. cassiicola* obtidos da cultura de soja, acerola, algodão e café foram testados frente a diversos fungicidas (TERAMOTO; SALVAIA; MARTINS, 2005).

O objetivo do trabalho foi determinar a DL50 para o fungo *P. pachyrhizi*, causador da ferrugem-asiática da soja, em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil nas safras 2010/11 e 2011/12, dos fungicidas tebuconazol, ciproconazol, metconazol e protioconazol, e comparar a DL50 para isolados de *C. cassiicola* depositados na micoteca da Embrapa Soja, coletados em diferentes anos e locais, com a DL50 para isolados da safra 2010/11, dos fungicidas carbendazim e protioconazol.

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

Artigo I: Sensibilidade do fungo *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas *in vivo* na safra 2010/11 e 2011/12.

Artigo II: Sensibilidade do fungo *Corynespora cassiicola* a fungicidas *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA SOJA

A soja é considerada a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal, em função da qualidade e do baixo custo de produção. É o quarto grão mais produzido mundialmente e o primeiro no Brasil (TECNOLOGIAS, 2011; CONAB, 2012).

Além de sua importância em valores econômicos, a soja apresenta-se como grão de valiosas características nutricionais para a alimentação humana e animal, principalmente como fonte de proteínas, fibras e gorduras insaturadas. O óleo, a lecitina e o farelo são exemplos de produtos de grande importância econômica obtidos a partir da soja (ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2006). A soja também tem se destacado como matéria-prima para a produção do biodiesel.

A produção nacional de soja na safra de 2010/2011, de acordo com o nono levantamento de grãos de junho de 2011 da Conab, foi de 74,9 milhões de toneladas, 6,30 milhões de toneladas superior à produção obtida na safra 2009/10. Entre os estados produtores, o maior produtor é o Mato Grosso, seguido do Paraná e do Rio Grande do Sul. A produção de soja na safra 2011/12 foi de 66,37 milhões de toneladas, tal resultado se deve exclusivamente às condições climáticas adversas, caracterizadas por estiagens nos principais estados produtores da região Sul do País (CONAB, 2012).

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil. Número esse que continua crescendo com a expansão para novas áreas e como consequência da monocultura intensiva (TECNOLOGIAS, 2011).

2.2 FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA

A ferrugem-asiática da soja é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. O fungo pertence ao filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Puccinales e família Phakopsoraceae. É uma das doenças de maior importância, em

consequência da alta agressividade do fungo, sendo a principal doença da soja em áreas tropicais e subtropicais (SINCLAIR; HARTMAN, 1999).

Na fase uredinal são produzidos os uredosporos que constituem o inóculo responsável pelas epidemias. Os uredosporos de *P. pachyrhizi* (15-24 x 18-34 µm) são ovóides a elipsóides com paredes de 1 µm de espessura, densamente equinulados e variando de incolor a castanho-amarelado pálido (SINCLAIR; HARTMAN, 1999). *Phakopsora pachyrhizi* possui teliosporos organizados em duas a sete camadas, com coloração marrom-amarelada, espessura em torno de 1 µm ou levemente mais grossa na região superior e com até 3 µm de espessuras nas células das camadas apicais, sendo essa a principal característica para diferenciar *P. pachyrhizi* de *P. meibomia* (agente causal da ferrugem americana da soja) (ONO; BURITICÁ; HENNEN, 1992).

A importância da ferrugem-asiática pode ser avaliada pela sua rápida expansão e pelo montante de perdas que tem causado (YORINORI, 2004). Sinclair e Hartman (1999) relataram danos em decorrência da ferrugem-asiática de 10% a 40% na Tailândia, 10% a 50% no sul da China, 23% a 90% em Taiwan e 40% no Japão.

Além da soja, esse fungo pode infectar mais de 60 espécies em 52 gêneros de leguminosas pertencentes à família Fabaceae (RYTTER; DOWLER; BROMFIELD, 1984; SLAMINKO et al., 2008). Esse patógeno possui a habilidade de penetrar diretamente a epiderme do tecido hospedeiro. A penetração direta no processo de infecção pode ajudar a entender a grande quantidade de hospedeiros desse patógeno e a dificuldade no desenvolvimento de cultivares resistentes (HARTMAN; MILES; FEDERICK, 2005).

O custo da ferrugem, que engloba o custo do controle com fungicidas mais as perdas em produtividade, desde seu surgimento no Brasil até a safra 2010/2011 está estimado na ordem de U\$15 bilhões (GODOY, 2011).

2.2.1 Histórico da Ferrugem-Asiática

A ferrugem-asiática foi descrita pela primeira vez no Japão como *Uredo sojae* Henn. (HENNING, 1993). Por volta de 1904, surgiu em caráter epidêmico em vários países no sudoeste da Ásia. Em 1976, foi descrita em Porto Rico. Em 1990 foi registrada na África, sendo que em janeiro de 1998, foi constatada

em Uganda, Kenia e Ruanda e em março de 2001, foi detectada na África do Sul, e em 2002, atingiu caráter epidêmico no continente africano (REIS; BRESOLIN, 2004). Especula-se que o inóculo chegou ao continente africano transportado por correntes de ar (CALDWELL; LAING, 2002).

No continente americano, foi descrita primeiramente no Paraguai, na safra 2001 (MOREL, 2001) e em maio de 2001 em plantas voluntárias no Oeste do Paraná. Na safra seguinte, a doença estava presente nos estados do Rio Grande do Sul (REIS; CASA; MICHEL, 2002), do Paraná, de São Paulo, do Mato Grosso do Sul, de Goiás, de Minas Gerais e do Mato Grosso, perfazendo aproximadamente 60% da área plantada de soja do Brasil (YORINORI, 2004). Segundo Yorinori e Paiva (2002), a semelhança, no aspecto visual, de lavouras afetadas por mancha parda e ferrugem e o uso de fungicidas para controle das doenças de final de ciclo, podem ter feito com que a ferrugem não fosse identificada em muitas lavouras e regiões, na safra 2001/2002. Na safra de 2002/2003, quase 100% da área de soja nacional foi afetada pela ferrugem-asiática (YORINORI, et al., 2005), além da Bolívia e do Uruguai (REIS; BRESOLIN; CARMONA, 2006). As perdas foram de US\$ 125 milhões na safra de 2001/2002, de US\$ 1 bilhão na safra de 2002/2003 e mais de US\$ 2 bilhões em 2003/2004 (YORINORI et al., 2005).

A ferrugem-asiática da soja foi constatada na Argentina em 2002 (ROSSI, 2003), Bolívia e Uruguai, em 2003, Colômbia e Estados Unidos da América, em 2004 (SCHNEIDER; HOLLIER; WHITAM, 2005).

2.2.2 Ciclo Biológico da Doença

O fungo *P. pachyrhizi* é biotrófico e depende de plantas hospedeiras vivas para sobreviver e se multiplicar. A presença de hospedeiros alternativos e plantas voluntárias são importantes para o desenvolvimento e a sobrevivência do patógeno quando o hospedeiro principal, no caso a soja, não está no campo (JACCOUD-FILHO et al., 2007).

O principal tipo de inóculo da ferrugem são os uredosporos. Esses esporos assexuais são pequenos e leves, sendo removidos das urédias presentes nas folhas infectadas quando se encontram com a superfície seca. Uma vez removidos, são transportados a longas distâncias pelo vento, podendo ser depositados em lavouras próximas ou distantes da fonte de inóculo inicial ou

primária. Por isso, a remoção e a disseminação ocorrem principalmente durante o dia, quando a superfície foliar está seca (REIS; BRESOLIN; CARMONA, 2006).

Os esporos depositados na superfície da folha, na presença de água e temperatura favorável iniciam o processo de germinação (REIS; BRESOLIN; CARMONA, 2006). A maioria dos esporos emite um tubo germinativo, formando apressório. Zambenedetti et al. (2007a), avaliando diferentes genótipos de soja, observaram a formação do apressório entre quatro e seis horas após a inoculação. Os mesmos autores sugerem que a porcentagem de germinação de esporos e de formação de apressórios possa estar relacionada ao genótipo avaliado.

A penetração ocorre diretamente através da cutícula (KOCH; EBRAHIM-NESBAT; HOPPE, 1983). Zambenedetti et al. (2007a), em todas as cultivares avaliadas, observaram que a penetração ocorreu sempre na junção das células da epiderme; também verificaram baixa penetração pelos estômatos e, quando o fato ocorreu, não observaram a formação de apressórios.

Em condições controladas, um mínimo de seis horas de continuidade de molhamento sobre a superfície da folha é necessário para que ocorram infecções, uma vez que a temperatura se mantenha em uma faixa favorável à infecção que varia de 18°C a 22°C (MARCHETTI; MELCHING; BROMFIELD, 1976; ALVES; FURTADO; BERGAMIN FILHO, 2006). Mais de 16 horas de duração do molhamento são necessárias para que a infecção ocorra quando a temperatura está próxima a valores extremos como 10°C ou de 26°C. Temperaturas acima da faixa favorável a infecção afetam negativamente a germinação dos esporos e, por consequência, a taxa de desenvolvimento da doença (KOCHMAN, 1979).

O período latente, que é o tempo entre o início da infecção e a esporulação, é afetado pela temperatura, sendo descrito como seis dias a 26°C (KITANI; INOUE, 1960). Experimentos mostraram um período mínimo de nove dias na temperatura de 24°C (ALVES; FURTADO; BERGAMIN FILHO, 2006). Esse período tende a aumentar conforme a temperatura se distancia desse ponto ótimo, em ambas as direções, podendo chegar a 12 ou 16 dias sob temperatura de 15°C (KITANI; INOUE, 1960; ALVES; FURTADO; BERGAMIN FILHO, 2006).

De acordo com Alexopoulos, Mims e Blackell (1996) fungos do grupo das ferrugens podem produzir cinco diferentes estágios em seu ciclo de vida: estágio 0 (espermogônios produtores de espermácias e hifas receptivas), estágio I (aécia

produzindo aeciosporos), estágio II (urédia produzindo uredosporos), estágio III (télia produzindo teliosporos) e estágio IV (basídias produzindo basidiosporos).

Phakopsora pachyrhizi tem sido descrito em seus estádios de urédia e telia, e a função da fase de telia não está totalmente esclarecida (MARCHETTI; MELCHING; BROMFIELD, 1976; YEH; TSCHANZ; SINCLAIS, 1981).

2.2.3 Sintomatologia

Os sintomas da ferrugem podem surgir em qualquer momento do ciclo de desenvolvimento da cultura (AZEVEDO et al., 2004). Os sintomas iniciais caracterizam-se por pequenas pústulas foliares (no máximo de 1 mm de diâmetro) mais escuros que o tecido sadio da folha, de coloração castanha a marrom-escuro. Na face abaxial das folhas pode-se observar uma ou mais urédias que se rompem liberando os esporos. As formas das lesões tendem para o formato angular e podem atingir 2 mm a 5 mm de diâmetro, podendo se desenvolver nos pecíolos, vagens e caules, porém são mais abundantes em folhas, principalmente na superfície inferior, onde podem ocupar extensas áreas e ao longo do tempo amarelecer e cair (SINCLAIR; HARTMAN, 1999).

Os esporos apresentam-se, inicialmente, hialinos e vão adquirindo coloração bege; acumulam-se ao redor das pústulas de onde serão dispersos pela ação do vento ou da chuva. O número de urédias por lesão é variável. Reis, Bresolin e Carmona (2006) relatam até 16 urédias por lesão e Yorinori (2004), relatam de uma a seis.

As primeiras lesões, em geral, são encontradas nas folhas da parte de baixo do dossel da planta de soja. A coloração das lesões depende da sua idade e da interação entre o genótipo da planta e o isolado do patógeno. Lesões do tipo "TAN" (castanha), sem necrose extensiva e com abundante esporulação, indicam reação de suscetibilidade. Lesões do tipo "RB" (reddish brown - marrom avermelhada) com extensiva necrose, menor número de urédias e pouca esporulação, indicam reação de resistência (BROMFIELD; HARTWIG, 1980; BROMFIELD, 1984).

O amarelecimento prematuro e a abscisão foliar podem ocorrer em função do aumento da densidade de lesões por folíolo. À medida que o número de lesões por unidade de área aumenta, o amarelecimento e a desfolha tornam-se mais

pronunciados. Cerca de 40 lesões/cm² determinam a desfolha da planta. A taxa ou a velocidade desse processo pode ser influenciada pela interação cultivar x isolado do fungo envolvido no processo infeccioso (FORCELINI et al., 2004).

2.2.4 Condições Ambientais Favoráveis

O progresso da ferrugem sofre influência do ambiente. Marchetti, Melching e Bromfield (1976) estudaram sob condições controladas o efeito da temperatura e da duração do período de molhamento no processo de infecção. Estudos em ambiente controlado, conduzidos no Brasil, demonstram que a temperatura ótima para a germinação do fungo situa-se entre 15°C e 25°C, com um período mínimo de molhamento foliar de 6 horas, aumentando a eficiência da infecção com 8 a 12 horas de molhamento (ALVES; FURTADO; BERGAMIN FILHO, 2006).

Até o momento, dados relacionados à precipitação pluviométrica são os que melhor têm explicado as epidemias de ferrugem da soja. Del Ponte et al. (2006) demonstraram a relação entre a precipitação acumulada durante 30 dias e a severidade máxima de ferrugem.

A precipitação exerce papel chave no desenvolvimento das epidemias. Vários são os relatos do papel da chuva na determinação dos níveis de severidade da doença observado em vários países. No Zimbábue, a severidade das epidemias foi variável entre as regiões e entre anos, sendo que as regiões com menor precipitação no sul do país são as menos afetadas pela ferrugem (LEVY, 2005). Na Austrália, epidemias mais severas foram reportadas nas regiões de altas precipitações ao longo do Richmond Valley (STOVOLD; SMITH, 1991). Na Tailândia, danos na produção de 10% a 15% foram registrados nas estações mais secas, enquanto que perdas de até 100% foram registradas na estação chuvosa (SANGAWONGSE; KITTISIN; NUNTHAPUN, 1977). Na África do Sul, epidemias mais severas foram observadas em anos de frequentes precipitações, enquanto que em estações mais secas os níveis de severidade foram baixos, podendo ser estimados por meio de equações preditivas com base na chuva (DEL PONTE et al., 2006).

Como citado por Bergamin Filho (2006), a chuva provavelmente permite a perfeita sincronização para ocorrência da infecção por favorecer a

liberação dos esporos, fornecer água líquida para a germinação e sob condições tropicais mantém a temperatura para a infecção próxima ao ideal. Pode-se acrescentar a esses fatores, o vento associado à ocorrência da chuva, favorecendo a liberação e dispersão dos esporos, além da nebulosidade que protege os esporos da radiação solar que inviabiliza sua germinação e tem se mostrado letal para os esporos (ISARD et al., 2006).

A temperatura tem influência, em interação com o molhamento, na eficiência de infecção e isoladamente na duração do período latente (ALVES; FURTADO; BERGAMIN FILHO, 2006). No campo, entretanto, a temperatura parece não ser tão limitante uma vez que na maioria das regiões tropicais e subtropicais, no período de cultivo de safra normal, essa se encontra na faixa ótima para o patógeno, aparentemente não causando estresse significativo, conforme verificado em um estudo com 34 epidemias no Brasil que mostrou fraca correlação entre a severidade máxima da doença e a temperatura média durante o desenvolvimento da epidemia (DEL PONTE et al., 2006).

2.2.5 Danos

O efeito da ferrugem sobre o rendimento da cultura da soja dependerá, também, do estágio de crescimento da cultura no qual a ferrugem se instalou e do tempo em que o processo doença se estendeu durante o cultivo. A ferrugem-asiática reduz a atividade fotossintética pela destruição dos tecidos foliares, causando desfolha prematura e redução no ciclo da soja. A queda prematura das folhas não permite a plena formação dos grãos (SINCLAIR; BACKMAN, 1989). Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e conseqüentemente maior a perda de rendimento e qualidade (YANG et al., 1991).

Sempre que a doença inicia o processo infectivo logo no início do estágio reprodutivo (R1/R2) da soja, é observado aumento significativo nos danos, embora a ocorrência da doença em estádios fenológicos mais avançados da planta também possa acarretar reduções consideráveis no rendimento (BALARDIN, 2004).

O efeito cumulativo da ferrugem sobre a produção se traduz em menor peso das sementes e na redução do número de vagens e sementes (SINCLAIR; BACKMAN, 1989).

Yang et al. (1991) estudando a influência da ferrugem da soja sobre o rendimento observaram redução no número de vagens por planta, redução no peso de grãos e redução no ciclo da cultura. Segundo Ogle; Byth e Mclean (1979) os danos relativos à ferrugem da soja estão associados com a redução no número de vagens por planta, números de grãos cheios por planta e ao peso de grãos. Também observaram redução no conteúdo de óleo no grão e ausência de alteração no teor de proteína. Kawuki, Adipala e Tukamunhabwa (2003) descrevem que os danos pela ferrugem da soja, em diferentes safras, estiveram associados com redução no peso das sementes e do número de vagens por planta.

Kochman (1979) e Ogle; Byth e Mclean (1979) mencionam danos pela ferrugem da soja, descritos por diversos pesquisadores, em diferentes regiões do mundo, entre 10% e 80%. Relatos de danos, em áreas experimentais na Austrália, Japão, China e Filipinas variam de 5% a 95% (HARTMAN; SINCLAIS; RUPE, 1999). Kawuki, Adipala e Tukamunhabwa (2003), em Uganda, descrevem danos em variedades comerciais entre 15,1% e 22,9%. No Paraguai, Morel (2001) cita danos de 50%.

2.2.6 Controle Químico

A principal medida de manejo para o controle da ferrugem-asiática da soja é a utilização de fungicidas. Diversos fungicidas têm sido avaliados para o controle da ferrugem da soja. Os primeiros estudos no oriente indicavam que fungicidas protetores, como mancozeb, eram eficientes na redução da severidade da ferrugem e na manutenção da produtividade, embora com resultados inconsistentes (SINCLAIR; HARTMAN, 1996). Em estudos realizados na Índia, Patil e Anahosur (1998) observaram que fungicidas do grupo dos triazóis, hexaconazol, triadimefon, propiconazol e difenoconazol, apresentavam melhor eficiência de controle do que mancozeb, tridemorph e chlorothalonil. Com a disseminação da ferrugem para o continente Africano e para a América do Sul, diversos fungicidas do grupo dos triazóis e as estrobilurinas, aplicados isoladamente ou em misturas, foram avaliados verificando-se alta eficiência de controle da doença (MILES et al., 2007)

As estrobilurinas, também conhecidas como fungicidas QoI, inibem a respiração de patógenos, sendo tipicamente absorvidas pela cutícula e classificadas, de acordo com sua mobilidade, como mesostêmicos. O produto pode ser absorvido

pela camada de cera, formando um depósito na folha, podendo ser redistribuído na superfície dessa pela sua fase de vapor. Os triazóis atuam inibindo a síntese de esterol, interferindo na formação e na seletividade da membrana plasmática dos fungos. Triazóis são absorvidos e translocados via xilema (acropetalmente) na planta. Embora geralmente não previnam a infecção, os triazóis podem matar o fungo na planta e prevenir a formação de pústulas e esporos. A translocação desses produtos depende do tipo de triazol, no entanto todos se movem acropetalmente, em um determinado grau, para onde há novo crescimento da planta (REIS; FORCELINI; REIS, 2007).

Produtos que constituem misturas de triazóis e estrobilurinas apresentam maior espectro de ação e resultados mais consistentes no controle da ferrugem e, conseqüentemente, maiores retornos em produtividade (MILES et al., 2007). Outra vantagem das misturas é o menor risco de seleção de populações resistentes do patógeno a ambos os produtos. As aplicações sequenciais do mesmo fungicida podem levar a seleção de populações resistentes ou menos sensíveis.

A seleção de populações de *P. pachyrhizi* menos sensíveis a triazóis foi observada ao final da safra 2007/08, nos estados do Mato Grosso e do Mato Grosso do Sul, no Brasil. A DL50 nos trabalhos de monitoramento da sensibilidade do fungo para o triazol tebuconazole, observado em 2007/08, atingiu valores de 3,9 ppm no Mato Grosso do Sul, enquanto populações sensíveis apresentam DL50 variando entre 0,01 a 1 ppm (SINGER et al., 2008). A partir dessa safra foi observada menor eficiência de triazóis em ensaios de fungicidas, realizados no final da safra, na região Centro-Oeste. Na safra 2009/10, a menor eficiência dos triazóis foi observada em ensaios realizados nas principais regiões produtoras do Brasil (GODOY et al., 2009) e somente as misturas de triazóis e estrobilurinas passaram a ser indicadas para o controle da ferrugem da soja (TECNOLOGIAS, 2008).

2.3 MANCHA-ALVO

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

O fungo possui como característica principal a ausência de reprodução sexual, sendo produzidos conídios a partir de células conidiogênicas

(KRUGNER; BACCHI, 1995). No estágio vegetativo, *C. cassiicola* produz micélio ramificado, pálido a amarronzado, com hifas tipicamente septadas (PERNEZNY; SIMONE, 1993). Os conídios são produzidos nos conidióforos, podem ser únicos ou em cadeia, de formato variável, clavado a cilíndrico, reto ou curvo, sub-hialino a marrom-oliváceo, com quatro a 20 pseudoseptos, de 40 µm a 220 µm de comprimento e 9 µm a 22 µm de espessura (ABUL-HAYJA; WILLIAMS, 2011).

A gama de hospedeiros consiste em mais de 350 espécies de plantas, distribuídas em diversos países de clima tropical e subtropical. Entre os hospedeiros, incluem-se culturas como pepino, caupi, soja, gergelim, quiabo, algodão, tomate, acerola, mamão papaya, mandioca, berinjela, fumo (SILVA et al., 1995).

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

A primeira pesquisa com esse patógeno foi feita por Almeida et al. (1976), que realizaram um levantamento de doenças de soja no norte do Estado do Paraná e sul do Estado de São Paulo. Os autores identificaram o fungo *C. cassiicola*, ocorrendo em plantios de soja do município de Tarumã, SP.

Almeida e Yamashita (1976) estudaram, em Londrina, PR, a influência de meios de cultura sobre o crescimento e a esporulação de isolados de *C. cassiicola* de soja submetidos à luz contínua ou escuro total. Concluíram que o meio V-8 (Suco de tomate-CaCO₃-Ágar) e o meio à base de alimento infantil induzem maior esporulação, e que a luz contínua favorece o crescimento e a esporulação. Almeida (1977) também verificou a influência do pH sobre o crescimento e a esporulação do patógeno, determinando que o máximo crescimento micelial e esporulação ocorria na faixa de pH de 6,5 a 7,5. De acordo com Almeida (1977), a presença da luz estimula a esporulação, embora a quantidade de esporulação não tenha sido uniforme entre os isolados.

2.3.1 Histórico da Mancha-Alvo

O primeiro relato de *C. cassiicola* foi na cultura do tomate, em Serra Leoa por Deighton (1936), citado por Kingsland (1986).

Na cultura da soja, o primeiro relato do patógeno foi nos Estados Unidos, em 1945 (OLIVE; BAIN; LEFEBVRE, 1945). No Brasil foi relatada pela primeira vez por Yorinori no Estado do Paraná, e por Almeida no Estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 1976). No entanto, esses autores não descreveram a realização da prova de patogenicidade.

Duarte, Albuquerque e Prabhu (1978) relataram a ocorrência de *C. cassiicola* em cacauzeiro no Estado do Pará. Este foi o primeiro registro da doença em caráter endêmico, considerando-se as regiões do mundo onde o cacau era cultivado. O dano causado no hospedeiro restringiu-se à redução de área foliar, por causa das inúmeras lesões formadas e que, posteriormente, coalesceram, mas sem provocar desfolhas. Ainda com relação ao isolado do fungo de cacauzeiro, Duarte, Asano e Albuquerque (1983) o compararam morfológica e fisiologicamente com um isolado de mamoeiro, constatando que o isolado do mamoeiro apresentou maiores dimensões de conídios e maior velocidade de crescimento, além de diferenças na capacidade de infectar diferentes hospedeiros, sugerindo, assim, a existência de duas raças do patógeno.

Alves, Lourd e Noda (1985) detectaram a ocorrência de *C. cassiicola* em caráter epidêmico em tomateiros de Manaus e, verificaram que o ataque do fungo foi mais severo em planta adulta, acentuando-se os sintomas nas folhas baixas. Os sintomas atingiram folhas, pecíolos e caule, sendo que, em estágio avançado, ocorreu a queda das folhas e ataque aos frutos.

Na safra de soja de 1987/88, a mancha-alvo foi constatada nos Estados de Mato Grosso, do Mato Grosso do Sul e do Rio Grande do Sul (YORINORI, 1989). Em 1995/96, a doença foi observada em diversas propriedades nos municípios de Cascavel, de Castro, de Ponta Grossa e de Pitanga, no Estado do Paraná, causando desfolha em diferentes níveis e redução de rendimento em todas as cultivares (YORINORI, 1996).

Silva, Rodrigues e Soares Júnior (1997) relataram a ocorrência da mancha de *C. cassiicola* em aceroleira na Ilha de São Luís, MA. Poltronieri et al.

(2003) detectaram três novos patógenos infectando aceroleiras no Estado do Pará, causando manchas foliares e queda da folhagem, sendo um deles *C. cassiicola*.

Oliveira, Laranjeira e Menezes (1999) relataram a ocorrência de *C. cassiicola* em frutos de mamão, cultivar Havaí, causando podridão-mole, no Estado de Pernambuco.

Martins et al. (2003), Verzignassi, Vida e Tessmann (2003) e Teramoto, Cavalcante e Martins (2006) identificaram em plantas de pepino tipo 'japonês', o patógeno *C. cassiicola*, em diversas regiões do Estado de São Paulo, do Paraná e de Goiás, respectivamente. Os sintomas foram caracterizados por lesões foliares circulares, necróticas, acarretando a desfolha da planta.

Cutrim e Silva (2003) testaram a patogenicidade de *C. cassiicola* isolado de tomateiro em diferentes espécies de plantas. Os autores concluíram que ocorre transmissão para outras hortaliças, como abóbora, maxixe, pimentão, quiabeiro e vinagreira, além de plantas daninhas como a trapoeraba, sendo essa uma importante contribuição para o estudo epidemiológico da doença.

2.3.2 Ciclo Biológico da Doença

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

Segundo Pernezny e Simone (1993) e Kurosawa et al. (2005), patógenos do gênero *Corynespora* tem vários meios de sobrevivência e disseminação no campo, podendo sobreviver mais de dois anos em restos de cultura. A ampla gama de hospedeiros de *C. cassiicola* também contribui para a sua sobrevivência no campo. A disseminação de *C. cassiicola* no campo é, predominantemente, pelo ar e ocorre normalmente no período matutino (PERNEZNY; SIMONE, 1993). O fungo *C. cassiicola* é capaz de penetrar direta e rapidamente através da superfície da epiderme em apenas 12 horas após a inoculação artificial do patógeno sobre as folhas do hospedeiro (BRÉTON; SANIER; D'AUZAR, 2000).

2.3.3 Sintomatologia

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

Os sintomas em folhas surgem como pequenos pontos com um halo amarelo, que crescem até 2 cm de diâmetro e tornam-se circulares, de coloração parda. O nome da doença se deve a anéis concêntricos, mais escuros no centro e halos amarelos presentes nas manchas, que lembram o formato de um alvo. O fungo pode atingir também os pecíolos e a haste, que se tornam marrom escuro, e, os entrenós, onde causa pequenos pontos alongados, formando lesões. Manchas nas vagens são geralmente circulares e de 1 mm de diâmetro, levemente deprimidas, roxo escuro e com margens marrom (ALMEIDA et al, 2005; SNOW; BERGGREN, 1989).

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

2.3.4 Condições Ambientais Favoráveis

A temperatura para o desenvolvimento do patógeno varia de 18°C a 21°C. O micélio em meio de cultura é branco e floculento, tornando-se mais tarde cinza escuro formando um emaranhado preto oliváceo (SNOW; BERGGREN, 1989; ELLIS, 1971, SEAMAN; SHOEMAKER; PETERSON, 1965). No entanto, Almeida et al. (1994) em trabalho sobre diferenciação de isolados de *C. cassiicola* demonstraram que o fungo se desenvolve vagarosamente em meio de cultura BDA, formando um micélio de coloração cinza-esverdeada.

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

2.3.5 Danos

A mancha-alvo ocorre no final do ciclo da soja, causando prejuízos econômicos, sendo mais severa em cultivares suscetíveis em épocas de elevada precipitação pluviométrica (PHILLIPS, 1989).

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

2.3.6 Controle Químico

O controle químico de *C. cassiicola* pode ser realizado por meio de tratamento de sementes, que visa a erradicação desse patógeno. No entanto, não foi claramente comprovada a eficiência da transmissão de *C. cassiicola* da semente para os órgãos aéreos da soja (AVOZANI, 2011). Recomenda-se a utilização da associação de carbendazim (150 g i.a. L⁻¹ SC) e tiram (350 g i.a. L⁻¹ SC) na dose de 200 mL do produto comercial para 100 kg de sementes (REIS; REIS; CARMONA, 2010). Devido aos relatos de menor eficiência do carbendazim no controle de *C. cassiicola* nas últimas safras, o uso desse ingrediente ativo pode ficar comprometido para o tratamento de sementes. Trabalhos realizados por Barcelos et al., (2010) com o objetivo de avaliar a eficiência de fungicidas para o controle químico da mancha-alvo em soja, no município de Campo Verde (MT), mostraram que as maiores produtividades foram obtidas nos tratamentos com piraclostrobina + epoxiconazol, ciproconazol + trifloxistrobina, tebuconazol + trifloxistrobina e propiconazol + trifloxistrobina, sendo que os fungicidas piraclostrobina + epoxiconazol, flutriafol + tiofanato metílico, ciproconazol + trifloxistrobina e propiconazol + trifloxistrobina resultaram nas menores severidades de mancha-alvo.

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

O fungicida indicado, pela Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, para o controle dessa doença é trifloxistrobina + protioconazol (56,2 + 24 g i.a. ha⁻¹) (TECNOLOGIAS, 2011).

2.4 FUNGITOXICIDADE E SENSIBILIDADE DE PATÓGENOS

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

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

O parâmetro DL50 define a fungitoxicidade de uma substância química (SHARVELLE 1961; TORGESON, 1967; EDGINGTON; KHEW; BARRON, 1971; LOOMIS, 1995; RUSSEL, 2004; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Edgington, Khew e Barron (1971) propõem os seguintes critérios para enquadrar os fungicidas benzimidazóis, com relação à fungitoxicidade: substância que apresenta DL50 < 1 ppm = alta fungitoxicidade e sensibilidade; DL50 entre 1 e 10 ppm = moderada fungitoxicidade, DL50 entre 10 e 50 ppm = baixa fungitoxicidade e insensibilidade; e DL > 50 ppm = não fungitóxico e insensibilidade ao fungicida.

A DL50 é específica e constante para uma determinada substância química e para um determinado patógeno. Um valor baixo da DL50 representa uma alta ação fungicida (REIS; FORCELINI; REIS, 2007). Loomis (1995), quando descreve sobre a toxicidade de uma droga, emprega o termo “potente” para uma substância química, se a dose requerida para produzir qualquer efeito estiver numa faixa muito baixa.

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

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

Se a DL50 de um fungicida, ao longo do tempo, apresentar alteração para valores superiores aos inicialmente estabelecidos, visando o controle de um determinado patógeno, poderá indicar redução na sensibilidade àquele fungicida (REIS; FORCELINI; REIS, 2007).

2.4.1 Métodos Utilizados para Avaliação da Fungitoxicidade de um Fungicida

Vários métodos têm sido descritos para mensuração da fungitoxicidade de uma substância química (AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 1947; SHARVELLE, 1961; GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004), 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.

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).

2.4.2 Testes *In Vivo*

Ensaio *in vivo* são necessários para aqueles patógenos biotróficos, nos quais procedimentos *in vitro* não estejam compatíveis com os objetivos almejados. 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 por uma delas dependerá 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; ALVES; ARAÚJO, 2007b; LI et al., 2008), assim como sua correlação com resultados obtidos em casa de vegetação e campo (TWIZEYIMANA et al., 2007).

Scherb e Mehl (2006), sugerem metodologia semelhante a de folíolos destacados, para a realização de testes de sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas, com destaque para fungicidas do grupo dos inibidores da demetilação (DMIs), o que pode ser observado em trabalhos realizados por Buzzerio et al. (2007), Iamamoto (2007), e Furlan e Scherb (2007). Nesse caso não é possível utilizar a metodologia *in vitro* com avaliação da germinação dos esporos, para o estudo da sensibilidade do fungo, pois o mecanismo de ação dos DMIs não age

paralisando o processo de germinação dos esporos, mas sim após o início do crescimento do tubo germinativo, quando inicia a síntese de ergosterol.

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).

2.4.3 Testes *In Vitro*

Testes *in vitro* podem ser direcionados tanto para patógenos necrotróficos (não obrigatórios) como para biotróficos (obrigatórios), embora, na sua maioria, envolvem 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 função de 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, estes 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). O mesmo autor também faz referência a um teste modificado, onde se utiliza o meio de cultura sólido, contudo com sobreposição de discos de papel filtro, embebidos nas devidas concentrações do fungicida em teste e, sobre esses, a deposição da suspensão de esporos.

A sensibilidade *in vitro* de isolados de *C. cassiicola* obtidos das culturas de soja, acerola, algodão e café foram testados frente a diversos fungicidas. O fungicida carbendazim a 1 ppm inibiu totalmente o crescimento micelial de todos os isolados, já o tebuconazol, inibiu os isolados de *C. cassiicola* de soja e de café. A 10 ppm, além dos produtos citados anteriormente para os respectivos isolados, o fungicida tiofanato metílico controlou os isolados de *C. cassiicola* de soja, de acerola e de café. Clorotalonil teve efeito inibitório no crescimento de isolados de *C. cassiicola* de soja. A 100 ppm o fungicida mancozeb inibiu totalmente o crescimento nos isolados de *C. cassiicola* de acerola e de algodão (TERAMOTO; SALVAIA; MARTINS, 2005).

2.4.4 Avaliação dos Resultados

Ensaio de fungitoxicidade ou de monitoramento da perda de sensibilidade são definidos através de parâmetros como DE50 (dose efetiva para matar 50% dos organismos), DL50, CL50 (concentração letal para matar 50% dos organismos), CE50 (concentração efetiva para matar 50% dos organismos), CI50 (concentração inibitória para matar 50% dos organismos) ou CMI (concentração máxima inibitória) (SHARVELLE 1961; TORGESON, 1967; LOOMIS, 1995; RUSSEL, 2004; SILVA, 2006; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Esses parâmetros podem, também, ser utilizados para classificar e comparar a toxicidade entre as moléculas testadas, através de índices como potência e eficácia (LOOMIS, 1995; SILVA, 2006; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Valores do tipo “dose-resposta” são obtidos quando se avalia a fungitoxicidade de uma molécula. A partir dos valores das doses e das respectivas respostas, identifica-se uma relação entre ambas e com base nessa relação estima-se uma dose efetiva (DE), ou letal (DL), por exemplo, que afetará “x” percentual da população em estudo. Um conjunto de métodos que permite analisar dados qualitativos dessa natureza é a análise de probit (LOOMIS, 1995; LOPES; OLIVEIRA, 2011).

3 ARTIGO A:

SENSIBILIDADE DO FUNGO *Phakopsora pachyrhizi* A FUNGICIDAS DO GRUPO DOS TRIAZÓIS *IN VIVO* NA SAFRA 2010/11 E 2011/12

3.1 RESUMO

Desde 2007 vem sendo observada no campo redução da eficiência de controle do fungo *Phakopsora pachyrhizi* por produtos do grupo químico dos triazóis. O objetivo do trabalho foi determinar a dose capaz de matar 50% (DL50) de populações do fungo *P. pachyrhizi*, coletados em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil, na safra 2010/11 e 2011/12, para os fungicidas tebuconazol, ciproconazol, metconazol e protioconazol. O bioensaio foi realizado de acordo com o método proposto pelo Comitê de Ações de Resistência a Fungicidas (FRAC). Foram coletadas amostras de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* de diferentes locais e utilizados os

esporos para inocular folhas destacadas previamente tratadas com fungicidas tebuconazol, ciproconazol, metconazol, nas concentrações de 0, 0,16, 0,45, 1,3, 3,8, 11 e 32 ppm para safra 2010/11 e 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 para safra 2011/12. Para protioconazol as concentrações foram 0, 0,02, 0,06, 0,164, 0,5, 1,4 e 8 ppm para safra 2010/11 e 0, 0,031, 0,065, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 ppm para safra 2011/12. A DL50 foi determinada nos ensaios com severidade acima de 5%. As médias das DL50s foram 0,33 ppm e 1,08 ppm para tebuconazol; 0,58 ppm e 3,31 ppm para ciproconazol; 0,37 ppm e 1,39 ppm para metconazol; 0,10 ppm e 0,13 ppm para protioconazol, respectivamente, para as safras 2010/11 e 2011/12. Dos quatro triazóis testados, o protioconazol apresentou menores valores da DL50, sendo as populações de *P. pachyrhizi* sensíveis a esse produto.

Palavras-chave Ferrugem-asiática. DL50. Fungitoxicidade.

ABSTRACT

Since 2007 has been observed field reduction efficiency control *Phakopsora pachyrhizi* by products of the chemical group of triazoles. The objective of this study was to determine the LD50 of populations of the fungus *P. pachyrhizi* collected in different soybean production regions in Brazil, in 2010/11 and 2011/12 crop seasons, for the fungicide tebuconazole, cyproconazole, metconazole and protioconazole. The bioassay was carried out according to Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) methodology. Samples were collected from soybean leaves infected with *P. pachyrhizi* of different locations and the spores were used to inoculate leaves detached and previously treated with fungicides tebuconazole, cyproconazole, metconazole, at concentrations of 0, 0,16, 0,45, 1,3, 3,8, 11 and 32 ppm for crop 2010/11 and 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ppm for crop 2011/12 and fungicide prothioconazole concentrations of 0, 0,031, 0,065, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 ppm for crop 2010/11 and 0, 0,031, 0,065, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 ppm for crop 2011/12. The LD50 was determined on assay with severity above 5%. The LD50s mean were 0,33 ppm and 1,08 ppm for tebuconazole; 0,58 ppm and 3,31 ppm for cyproconazole; 0,37 ppm and 1,39 ppm for metconazole; 0,10 ppm and 0,13 ppm for

prothioconazole, respectively for the crop 2010/11 and 2011/12. Of the four triazoles tested, prothioconazole showed lower values of LD50, being the populations of *P. pachyrhizi* sensitive to this product.

Key-words: Asian soybean rust. LD50. Fungitoxicity.

3.2 INTRODUÇÃO

Os triazóis são fungicidas inibidores da biossíntese de ergosterol, importante componente da membrana celular dos fungos sensíveis, tendo como sítio primário de atuação a demetilação do C-14, razão pela qual são classificados como fungicidas DMI (GODOY et al., 2012). Os triazóis estão entre principais produtos para controle de várias doenças em diferentes culturas (MEHL, 2009), inclusive a ferrugem-asiática da soja (FAS) causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.

O grupo dos patógenos que causam ferrugens é classificado como patógenos de baixo risco de resistência (BRENT, 1999). Entretanto, *P. pachyrhizi* apresenta fatores múltiplos de virulência, alta variabilidade genética, esporulação

abundante, curto período de multiplicação e grande número de hospedeiros (HARTMAN; MILES; FEDERICK, 2005; SLAMINKO, et al., 2008; YAMAOKA et al., 2002). Além disso, a cultura da soja ocupa grandes áreas agrícolas onde se realizam frequência de aplicações de fungicidas proporcionada pela extensa época de semeadura, eventualmente são utilizados sub-doses pelos produtores e aplicações curativas (MILES et al., 2007). Todos esses fatores têm levado ao aumento da pressão de seleção determinando populações menos sensíveis aos fungicidas.

O método de folíolos destacados para utilização com o fungo *P. pachyrhizi* é descrita por Yeh (1983) em seus estudos para diferenciação de raças fisiológicas, sendo sua eficiência comprovada por outros autores, com distintos objetivos de pesquisa (BURDON; MARSHALL, 1981; BANDYOPADHYAY et al., 2007; TWIZEYIMANA et al., 2007; ZAMBENEDETTI; ALVES; ARAÚJO, 2007b; LI et al., 2008), assim como sua correlação com resultados obtidos em casa de vegetação e campo (TWIZEYIMANA et al., 2007). Scherb e Mehl (2006), sugerem método, semelhante ao descrito anteriormente, para a realização de testes de sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas, com destaque para fungicidas do grupo dos inibidores da demetilação (DMIs), o que pode ser observado em trabalhos realizados por Buzzerio et al. (2007), Iamamoto (2007) e Furlan e Scherb (2007). O ideal seria comparar as respostas das populações de *P. pachyrhizi* presentes hoje com a faixa de suscetibilidade de populações não expostas aos fungicidas DMIs. No entanto, isso não seria possível, já que, mesmo antes da entrada da FAS no Brasil, em 2001, esses produtos já eram utilizados na cultura para outros patógenos (KOGA; LOPES; GODOY, 2009).

O objetivo do trabalho foi determinar a DL50 de populações do fungo *P. pachyrhizi*, coletadas em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil, na safra 2010/11 e 2011/12, para os fungicidas tebuconazol, ciproconazol, metconazol e prothioconazol.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram recebidas amostras de folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi* proveniente de lavouras de nove e seis estados brasileiros na safra 2010/11 e 2011/12, respectivamente. As folhas foram coletadas de lavouras

comerciais de soja, acondicionadas em sacos de papel e enviadas para o laboratório da Embrapa Soja pelo correio. Imediatamente após o recebimento, o material foi armazenado em câmara fria a 5°C até o seu processamento.

Para o estudo da sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas, foi utilizado o método de inoculação em folha destacada recomendado pelo Comitê de Ação e Resistência a Fungicida – FRAC (SCHERB; MEHL, 2006). Para isso, utilizaram-se unifólios da cultivar CD 219 RR livres da FAS, semeada periodicamente em casa-de-vegetação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos (doses) e quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma placa de petri de 15 cm de diâmetro contendo três unifólios de soja.

Para realizar o cálculo das DL50, as doses dos fungicidas utilizados foram estabelecidas para obter de zero a 100% de controle da FAS. Na safra 2010/11 os triazóis avaliados foram o tebuconazol (Folicur[®], Bayer), ciproconazol (Alto 100[®], Syngenta), metconazol (Caramba[®], Basf), nas concentrações de 0,0; 0,01; 0,02; 0,05; 0,16; 0,45; 1,31; 3,80; 11,03; 32,0 µg L⁻¹ (ppm) e protioconazol (Proline[®], Bayer) nas concentrações de 0; 0,001; 0,002; 0,007; 0,020; 0,057; 0,164; 0,476; 1,379; 8,0 ppm. Na safra 2011/12, os triazóis avaliados foram o tebuconazol (Folicur[®], Bayer), ciproconazol (Alto 100[®], Syngenta), metconazol (Caramba[®], Basf), nas concentrações de 0,0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 µg L⁻¹ (ppm) e protioconazol (Proline[®], Bayer) nas concentrações de 0; 0,031; 0,065; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 ppm. As concentrações utilizadas para o protioconazol foram menores porque em ensaio conduzido nas safras anteriores, 100% de controle da FAS ocorreu na concentração de 0,25 ppm, o que prejudicou o ajuste dos dados ao modelo estatístico. Os triazóis selecionados apresentam registro para aplicações na soja e/ou apresentavam alta eficiência no controle da FAS em ensaios realizados no campo (GODOY et al., 2007).

Unifólios totalmente expandidos da cultivar CD 219 RR foram seccionados das plantas e levados para laboratório onde foram imersos nas soluções com os fungicidas, nas diferentes concentrações, contidas em copos plásticos descartáveis, por cinco segundos. O volume final da solução de cada concentração fungicida testada foi de 100 mL. Em seguida, os unifólios foram colocados (com a face abaxial voltada para cima) nas placas de Petri, contendo dois papéis absorventes saturados com água destilada. Foram distribuídos 3 unifólios por

placa, totalizando 12 unifólios por tratamento. Após período de 6 a 24 horas, procedeu-se à inoculação dos esporos por atomização com aerógrafo. Esse período foi estabelecido para possibilitar que a solução fungicida remanescente nos unifólios secasse. Os esporos utilizados na inoculação foram coletados a vácuo das amostras de folhas recebidas das diferentes regiões produtoras e suspensos em água destilada acrescentada de Tween 20 (0,1% v/v). A quantificação dos esporos na suspensão foi realizada com o hemacitômetro e buscou-se obter a concentração máxima de cada amostra.

Para a quantificação da porcentagem de esporos viáveis, 1 mL da suspensão de esporos foi colocado em placas de petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura ágar-água. As placas de petri foram incubadas em BOD a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, no escuro. Após o período de 4 horas foi quantificada a porcentagem de esporos germinados, em 100 esporos por repetição, tomados ao acaso sob microscópio ótico com aumento de 10X. Os esporos foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo ultrapassou o diâmetro do esporo.

Após a inoculação com aerógrafo, as placas com os unifólios foram acondicionadas em saco plástico umedecido e incubadas em câmaras de crescimento, com temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, com 12 horas de fotoperíodo e umidade relativa mínima de 60% por 14 dias. Após esse período foram realizadas as avaliações de severidade com auxílio da escala diagramática proposta por Godoy, Koga e Canteri (2006).

A porcentagem de controle de cada fungicida foi calculada conforme a equação, $PC=100(1-X_{ij})/ X_{\max}(\text{test})$, onde PC é a porcentagem de controle; X_{ij} é a severidade observada na concentração i da repetição j ; $X_{\max}(\text{test})$ é a severidade máxima observada no tratamento testemunha.

Os dados foram linearizados pela função logaritmo da porcentagem de controle, na base 10. As estimativas das doses letais (DL50) foram obtidas pelo modelo de regressão probit, Proc Probit, do sistema SAS[®] Versão 9.1.3.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras recebidas de folhas de soja infectadas com FAS, durante a safra 2010/11 e 2011/12 foram obtidas 61 populações, das quais foram utilizadas 37 e 24 populações para o primeiro e segundo ano de ensaio,

respectivamente. Os principais problemas que inviabilizaram o aproveitamento das amostras foram o envio de quantidade insuficiente de folhas, envio de folhas que apresentavam baixa severidade, folhas coletadas de áreas que receberam aplicação de fungicidas, folhas que apresentavam alta severidade, mas com lesões mortas (das quais não foi possível realizar a coleta de esporos), o longo período decorrido entre a coleta e o recebimento das amostras (de até oito dias) e as altas temperaturas que as amostras foram submetidas durante o transporte.

A DL50 foi determinada apenas nos ensaios em que as folhas testemunhas apresentaram severidade acima de 5% (16 bioensaios na safra 2010/11 e 13 bioensaios na safra 2011/12) (Tabela 3.1). Os demais bioensaios, em razão da baixa viabilidade dos esporos, não desenvolveram doença suficiente.

Tabela 3.1 Quantidade de amostras recebidas por Estado, tempo decorrido da coleta ao recebimento, concentração da suspensão de esporos, germinação e severidade máxima nas safras 2010/11 e 2011/12.

Estados	Nº de amostras	Tempo coleta ao recebimento (dias)	Concentração da suspensão de esporos ([] x10 ⁴ /mL)	Mínima e máxima germinação (%)	(%) Germinação média	Sev. máxima (%)	Sev. máxima média (%)
Safra 2010/11							
PR	9	0 a 7	23,62 a 114,50	0,00 a 95,00	49,92	6,33 a 19,67	13,97
MG	1	2	29,25	0,00	0,00	14,42	14,42
MS	3	1 a 3	24,37 a 92,25	0,00 a 50,00	16,67	5,83 a 8,08	22,40
GO	1	2		0,00	0,00	25,50	25,50
RS	2	3 a 8	28,17 a 43,37	0,00	0,00	17,50 a	23,59

								29,67
Total	16	-	-	-	-	-	-	-
Safra 2011/12								
PR	4	0 a 1	3,50 a 68,63	28,00 a	37,33	5,42 a	10,79	
				43,00		19,98		
MG	2	2	31,13 a 31,50	28,00	28,00	11,81 a	19,41	
						27,00		
GO	1	3	34,38	-	-	7,33	7,33	
RS	1	3	9,38	60,00	60,00	22,75	22,75	
MT	3	1 a 2	15,80 a 46,88	31,00	31,00	7,00 a	16,13	
						33,00		
SP	2	4	24,88	34,00	34,00	6,29 a	13,11	
						19,92		
Total	13	-	-	-	-	-	-	-

Na safra 2010/11 a porcentagem média de controle do tebuconazol, na dose máxima utilizada, foram de 99,83%, 100%, 93,83%, 100% e 90,86% para as populações de FAS coletadas nos estados do PR, de MG, do MS, de GO, do RS, respectivamente. Para o fungicida ciproconazol foram de 94,05%, 97,36%, 55,67% para as populações de *P. pachyrhizi* coletadas nos estados do PR, do MS e do RS, respectivamente. Para o metconazol foram de 99,49%, 100%, e 95,45% para as populações coletadas nos estados do PR, de MG e do MS, respectivamente. Para o protioconazol as porcentagens de controle foram de 98,17%, 100%, 98,47 e 99,91% para as populações coletados nos estados do PR, de MG, do MS e de GO, respectivamente.

Na safra 2011/12 a porcentagem média de controle obtida na dose máxima utilizada foi de 97,86%, 99,44%, 99,89%, 22,75%, 97,28% e 95,82% para o tebuconazol; de 91,57%, 86,42%, 98,42%, 93,17%, 96,83% e 99,20 para o ciproconazol; de 98,81%, 97,86%, 98,42%, 99,11%, 93,13% e 99,25% para o metconazol; e de 99,12%, 99,38%, 100%, 85,37%, 98,20% e 99,34% para o protioconazol, para as populações coletadas nos estados do PR, de MG, de GO, do RS, do MT e de SP, respectivamente.

Os valores da DL50 para as populações de *P. pachyrhizi* expostas a tebuconazol variaram de 0,001 ppm a 1,490 ppm e 0,003 a 3,492 ppm, respectivamente, nas safras 2010/11 e 2011/12 (Figura 3.1 e 3.2). A média do valor

da DL50 foi 0,328 ppm e 1,080 ppm para o tebuconazol. A população de Santa Bárbara do Sul, RS, coletada em março, foi a mais sensível e a população de Ponta Grossa, PR, coletada no mês de março, apresentou-se menos sensível na primeira safra. Na safra 2011/12, a população mais sensível foi a coletada em Primavera do Leste, MT, e a população menos sensível foi a de Mauá da Serra, PR, coletada no mês de março.

Figura 3.1 Distribuição dos valores da DL50 e seus respectivos limites inferior e superior de sensibilidade ao tebuconazol (A), ciproconazol (B), metconazol (C), protioconazol (D) das populações de campo de *Phakopsora pachyrhizi* de várias regiões produtoras de soja no Brasil, safra 2010/11.

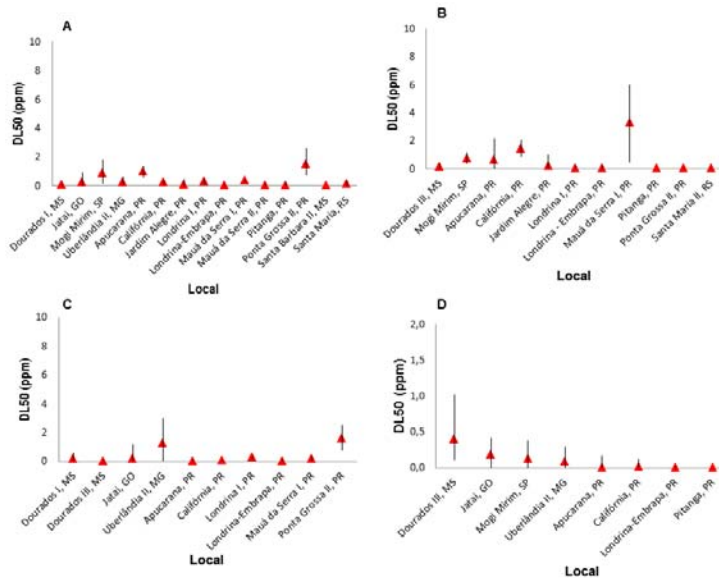
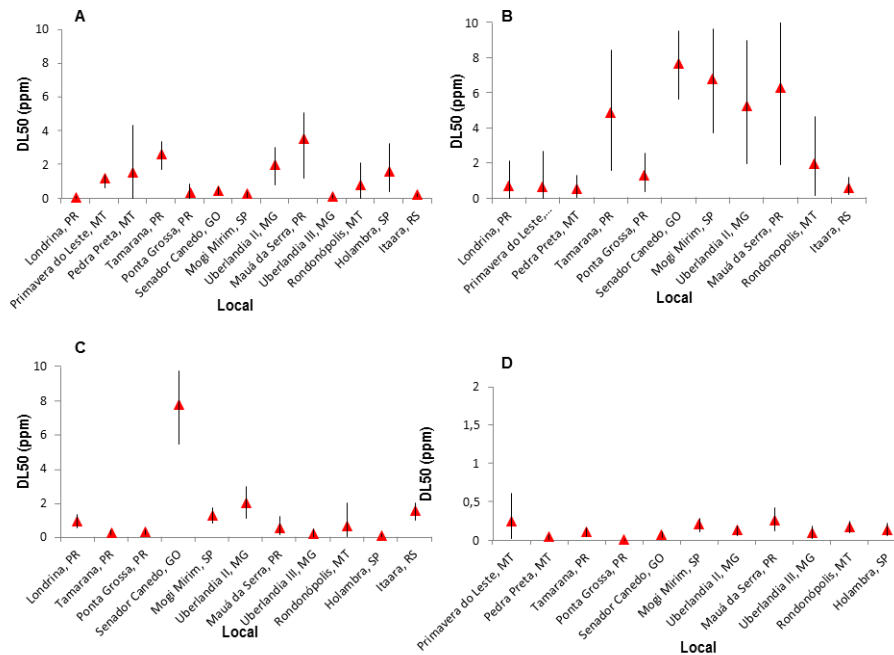


Figura 3.2

Distribuição dos valores da DL50 e seus respectivos limites inferior e superior de sensibilidade ao tebuconazol (A), ciproconazol (B), metconazol (C), protioconazol (D) das populações de campo de *Phakopsora pachyrhizi* de várias regiões produtoras de soja no Brasil, safra 2011/12.



Na safra 2010/11 os valores da DL50 nas populações de *P. pachyrhzi* tratadas com ciproconazol variaram de 0,001 ppm a 3,268 ppm (Figura 3.1), com média do valor da DL50 de 0,588 ppm. A população de Santa Maria, RS, coletada em abril, foi a mais sensível ao ciproconazol e a menos sensível foi a população de Mauá da Serra I, PR, coletada no mês de fevereiro de 2010/11. Na safra 2011/12 os valores da DL50 variaram de 0,490 ppm a 7,650 ppm (Figura 3.2), com média da DL50 de 3,310 ppm. A população mais e menos sensível ao ciproconazol foram, respectivamente, a coletada em Pedra Petra, MT, e a de Senador Canedo, GO, ambas coletadas no mês de março.

Para o metconazol, na safra 2010/11, os valores da DL50 foram de 0,004 ppm a 1,581 ppm, com média de 0,372 ppm (Figura 3.1). A população de Dourados, MS, coletada em março foi a mais sensível ao metconazol e, da mesma forma que para o tebuconazol na safra 2010/11, a população de Ponta Grossa, PR, coletada no mês de março foi a menos sensível. Em 2011/12, os valores da DL50 para o metconazol variaram de 0,033 a 7,727, com média de 1,386 (Figura 3.2). A população mais sensível foi coletada em Holambra, SP, no mês de abril e da mesma forma que observado para o produto ciproconazol na safra de 2011/12 a população menos sensível foi a de Senador Canedo, GO, coletada em março.

Os valores da DL50 para o fungicida protioconazol variaram de $7,22E^{-07}$ ppm a 0,396 ppm (Figura 3.1), e a média da DL50 de 0,115 ppm na safra 2010/11. A população de Pitanga, PR, coletada em março apresentou-se mais sensível. Ao contrário do observado para o metconazol na safra 2010/11, a população que apresentou a menor sensibilidade ao protioconazol foi a de Dourados, MS, coletado em março de 2011. Na safra seguinte, 2011/12 os valores da DL50 variaram de 0,009 ppm a 0,260 ppm, com média de 0,130 ppm (Figura 3.2). Para o protioconazol, na safra 2011/12, a população mais e menos sensível foram coletadas no Estado do Paraná, sendo a coletada em Ponta Grossa, no mês de março, a mais sensível e a coletada em Mauá da Serra, em março, a menos sensível.

As populações de *P. pachyrhizi* foram separadas em quatro classes dependendo da sua sensibilidade aos fungicidas testados, como: sensível (S) = valores de DL50 entre 0,1 e 1 ppm; ligeiramente resistente (LR) = valores de DL50 entre 1 e 10 ppm; medianamente resistente (MR) = valores de DL50 entre 10 e 100 ppm; altamente resistente (AR) = valores de DL50 acima de 100 ppm (IACOMI-VASILESCU et al., 2004).

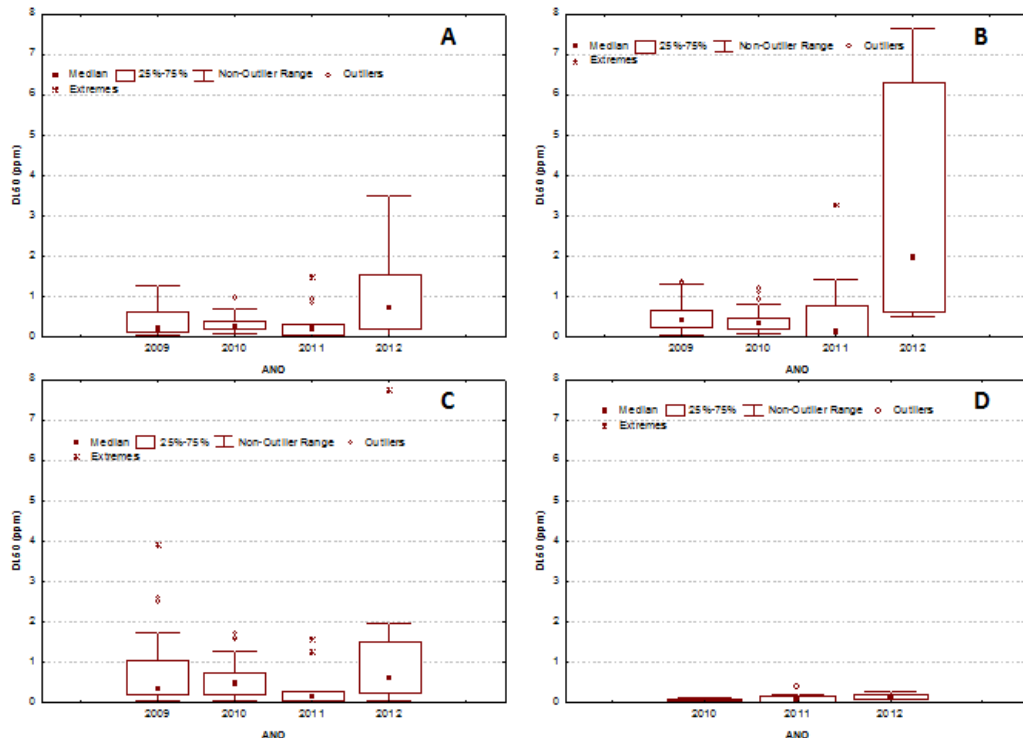
De acordo com a classificação acima, na safra 2010/11 as populações de *P. pachyrhizi* foram sensíveis aos quatro fungicidas testados. Na safra 2011/12, as populações de *P. pachyrhizi* apresentaram-se sensíveis apenas ao protioconazol e para os demais triazóis o fungo apresentou-se ligeiramente resistente.

Embora na safra 2010/11 tenha ocorrido 6,67%, 18,18% e 20,00% de valores da DL50 entre 1 a 10 ppm para o tebuconazol, ciproconazol e metconazol respectivamente, o que indica moderada fungitoxicidade e sensibilidade, esses valores foram observados, na maioria das vezes, nas coletas realizadas ao final da safra e de populações de *P. pachyrhizi* coletadas no Estado do Paraná. Observações de menor sensibilidade do patógeno pode ser um sinal de controle bem sucedido, com indivíduos menos sensíveis se concentrando em uma população sobrevivente pequena, uma vez que as coletas eram realizadas em áreas com aplicações de fungicidas (SCHULZ; SCHEINPFLUG, 1986; BRENT, 1999). No caso de amostras coletadas em áreas sem aplicação de fungicidas, pode ser o resultado da deriva das aplicações de áreas próximas. Em ambos os casos, pode ser apenas

a flutuação normal das populações de patógenos durante a safra (KOGA; LOPES; GODOY, 2009).

Os valores obtidos no presente trabalho são similares aos valores estimados nas safras 2008/09 e 2009/10 por KOGA, LOPES e GODOY, (2009) (Figura 3.3), sendo que nessas safras, de acordo com os valores da DL50, as populações de *P. pachyrhizi* apresentaram-se sensíveis aos triazóis tebuconazol, ciproconazol, metconazol e protioconazol. As médias da DL50 para as safras 2008/09 e 2009/10 foram respectivamente de 0,77 ppm e 0,58 ppm para o tebuconazol, 0,53 ppm e 0,41 ppm para o ciproconazol, 0,38 ppm e 0,32 ppm para o metconazol. Para o protioconazol, na safra 2008/09, não houve distribuição dos valores de DL50, pois com 0,25 ppm, as populações das amostras avaliadas não desenvolveram sintomas da FAS, e na safra seguinte, 2009/10, a média da DL50 foi 0,059 ppm.

Figura 3.3 Monitoramento da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* aos triazóis tebuconazol (A), ciproconazol (B), metconazol (C), protioconazol (D) nas safras 200/09, 2009/10, 2010/11 e 2011/12.



Blum (2009) trabalhando com sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas para esporos de FAS expostos ao tebuconazol, encontrou valores de DL50 de 0,41 e 0,81 ppm avaliando o número de lesões por cm^2 , e de 0,32 e 0,77

ppm avaliando número de pústulas por cm^2 , para o experimento 1 e 2, respectivamente. Embora o método utilizado pelo autor para a quantificação da doença tenha sido diferente do utilizado neste trabalho, os valores descritos para o fungicida tebuconazol se aproximam dos valores encontrados no presente trabalho (média da DL50 de 0,33 ppm e 1,08 ppm nas safras 2010/11 e 2011/12, respectivamente). O mesmo não foi observado quando se analisam os valores encontrados para o fungicida metconazol, sendo que no presente trabalho a média da DL50 foi de 0,37 ppm e 1,39 ppm, enquanto no trabalho desenvolvido por Blum (2009) os valores foram superiores, tanto para número de lesão por cm^2 (DL50=2,5 ppm) quanto para número de pústulas por cm^2 (DL50=2,61 ppm).

Iamamoto (2007), avaliando quatro formulações comerciais de tebuconazol descreve valores de DL50 na ordem de 0,65 ppm, 0,75 ppm, 1,5 ppm e 3,1 ppm. Furlan e Scherb (2007), avaliando quatro formulações comerciais de tebuconazol estimaram valores de DL50 na ordem de 0,54 ppm (Folicur EC200), 0,81 ppm (Orius 250 CE), 1,5 ppm (Rival 200 CE) e 1,6 ppm (Tebuconazol Nortox), evidenciando diferença entre produtos comerciais, conforme já descrito por Russel (2004). Os valores descritos para o fungicida tebuconazol (média da DL50 de 0,33 ppm e 1,08 ppm), no presente trabalho (formulação Folicur 200 CE), se aproximam aos valores descritos na literatura.

Buzzerio (2007) conduzindo trabalhos de monitoramento da sensibilidade de *P. pachyrhizi*, *in vivo*, na safra de soja de 2006/07, avaliou o fungicida ciproconazol e relatou valores de DL90s (dose letal para reduzir 90% da população) numa faixa entre 0,09 e 0,5 ppm. Os dados relatados por Buzzerio (2007), para o fungicida ciproconazol, se aproximam das DL50 encontrados no presente trabalho durante a safra 2010/11 (média da DL50 de 0,59 ppm) e diferem aqueles obtidos por Blum (2009), onde os valores de DL50s para o ciproconazol foram superiores, tanto para número de lesões (DL50 de 1,25 e 3,06 ppm para o experimento 1 e 2 respectivamente), quanto para número de pústulas (DL50 de 0,89) de *P. pachyrhizi* por cm^2 . No entanto, o método de quantificação da doença utilizado por Blum difere do método utilizado no presente trabalho e por Buzzerio, onde foi utilizado o método recomendado pelo FRAC Brasil (estimou-se a severidade da doença), o que poderia explicar as variações nos resultados encontrados.

Junqueira (1982), em trabalhos sobre controle químico de FAS, determinou valores de DL50, *in vivo* (número de lesões por cm²; folíolos não destacados), para os fungicidas benomil (7,5 ppm), triadimefon (38,3 ppm), triforine (18,3 ppm), oxicloreto de cobre (296,2 ppm), clorotalonil (5,7 ppm) e maneb (0,75 ppm).

O desenvolvimento da resistência aos DMIs ocorre de forma gradual, ou seja, a partir da seleção direcional. Apesar do seu modo de ação ser específico (ação em um processo metabólico), e ser intensivamente utilizado como fungicida de amplo espectro, a seleção de resistência aos DMIs não ocorre de forma súbita ou completa, possivelmente em função da adaptabilidade patogênica das sub-populações resistentes (KOLLER; SCHEIPFUG, 1987; NIKLAUS et al., 2006). Evidências experimentais sugerem que os mutantes resistentes aos azóis são menos adaptados do que as sub-populações sensíveis. Mesmo sendo selecionados no campo, genótipos resistentes parecem não ser suficientemente vigorosos para competir com sucesso com os genótipos sensíveis e aumentar a sua frequência (DEKKER, 1985). Por essa razão as avaliações de sensibilidade devem sempre ser feitas a partir das amostras recebidas do campo e não de multiplicações dessas amostras, pois possivelmente ocorrerá a prevalência da sub-população sensível sobre a resistente durante o processo de multiplicação (KOGA; LOPES; GODOY, 2009).

Muitos métodos têm sido descritos para mensuração da fungitoxicidade de uma substância química (AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 1947; SHARVELLE, 1961; GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004), tendo como objetivo o estudo, em si, da sensibilidade de um fungo a um determinado fungicida ou ainda o monitoramento da redução parcial ou mesmo a perda da sensibilidade (resistência). Para a ferrugem 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, com distintos objetivos de pesquisa (BURDON; MARSHALL, 1981; BANDYOPADHYAY et al., 2007; TWIZEYIMANA et al., 2007; ZAMBENEDETTI; ALVES; ARAÚJO, 2007b; LI et al., 2008), assim como sua correlação com resultados obtidos em casa de vegetação e campo (TWIZEYIMANA et al., 2007).

O fungicida protioconazol apresentou maior eficiência no controle de *P. pachyrhizi*, com os menores valores de DL50, sendo todas as populações de *P.*

pachyrhizi, testados no presente trabalho, sensíveis a esse produto nos dois anos de ensaio. Para os demais produtos, tebuconazol, ciproconazol e metconazol, as populações de FAS, na média da DL50, apresentaram-se sensíveis na safra 2010/11 e ligeiramente resistentes na safra 2011/12. Ensaio de campo visando testar a eficiência de fungicidas no controle da FAS em diversos estados brasileiros (GODOY et al., 2012), confirmam os resultados obtidos no presente trabalho, pois mostraram menor eficiência para os fungicidas tebuconazol e ciproconazol, quando utilizados isoladamente, a partir da safra 2007/08 na região Centro-Oeste, e nas demais regiões a partir da safra 2008/09. O fungicida prothioconazol, até 2007, apresentava alta eficiência em aplicações isoladas, mas não foi avaliado isoladamente após 2007. Embora os triazóis tebuconazol e ciproconazol tenham apresentado menor eficiência nos ensaios eles ainda apresentam eficácia para controle de *P. pachyrhizi* (GODOY et al., 2011; 2012). A seleção de populações de *P. pachyrhizi* menos sensíveis, o que está de acordo com os valores de DL50 observados nesse trabalho segundo os níveis estabelecidos por Iacomi-Vasilescu et al. (2004)

3.5 CONCLUSÃO

Dos quatro triazóis testados, o protioconazol apresentou menores valores da DL50, sendo as populações de *P. pachyrhizi* sensíveis a esse produto.

4 ARTIGO B:

SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* AOS FUNGICIDAS CARBENDAZIM E PROTIOCONAZOL *IN VITRO*

4.1 RESUMO

A mancha-alvo da soja é causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*. A razão para o atual aumento desta doença nas lavouras de soja pode ser a resistência a vários fungicidas usados para o controle dessa doença. O objetivo deste estudo foi determinar a DL50 para isolados de *C. cassiicola* depositados na Micoteca da Embrapa Soja, coletados em diferentes anos e locais, com a DL50 de isolados coletados na safra 2010/11, para carbendazim e protioconazol. Foram utilizados 24 isolados de *C. cassiicola* submetidas aos fungicidas carbendazim e prothoconazol nas doses de 0,5, 1, 10, 100 e 1000 ppm. Os valores da DL50 foram estimados pelo Proc Probit, SAS ®. A DL50 variou de 0,47 a 26,44 ppm para o produto protioconazol, e 0,30 a 691,19 ppm o produto carbendazim. Os valores de DL50 obtidos indicam a selecção de isolados resistentes a benzimidazois ao longo do tempo. Observou-se redução na sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* para protioconazol e perda de sensibilidade de sete isolados, MES 646, MES 649 , MES 651, MES 931, MES 932, MES 930 e MES 933, para carbendazim.

Palavras-chave Mancha-alvo. DL50. Fungitoxicidade.

ABSTRACT

The target-spot of soybean is caused by the fungus *Corynespora cassiicola*. A reason for the current increase in this disease in soybean crops may be the resistance to various fungicides used to control this disease. The objective of this study was to determine the LD50 for isolates of *C. cassiicola* deposited in mycology collection at Embrapa Soybean, collected in different years and locations, and isolated in 2010/11, for carbendazim and prothioconazole. It Were used 24 isolates of *C. cassiicola* subjected to fungicides carbendazim and prothioconazol at the doses of 0.5, 1, 10, 100 and 1000 ppm. The EC50 values were estimated by Proc Probit, SAS®. The LD50 ranged from 0,47 to 26,44 ppm for prothioconazole and from 0,30 to 691,19 ppm for carbendazim. The LD50 obtained values suggest the selection of isolates resistant to benzimidazoles over time. It was observed sensitivity reduction of isolates of *C. cassiicola* for prothioconazole and loss of sensitivity of isolates MES 646, MES 649, MES 651, MES 931, MES 932, MES 930 and MES 933 for carbendazim.

Key-words Target-spot. LD50. Fungitoxicity.

Dentre as doenças que ocorrem na cultura da soja, a mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei, vem ganhando importância em decorrência da maior incidência nas lavouras em função do aumento da semeadura de cultivares suscetíveis. (AVOZANI, 2011). A doença é encontrada em praticamente todas as regiões de cultivo de soja do Brasil, acreditando seu agente causal ser nativo e infectar um grande número de espécies de plantas. O fungo *C. cassiicola* pode sobreviver em restos de cultura e sementes infectadas, sendo essa uma das formas de disseminação. Condições de alta umidade relativa e temperaturas amenas são favoráveis à infecção na folha. Os sintomas mais comuns são manchas nas folhas, com halo amarelado e pontuação escura no centro, podendo causar severa desfolha em cultivares suscetíveis (SOARES; GODOY; OLIVEIRA, 2009).

Trabalhos relatam que o desenvolvimento de resistência de isolados de *C. cassiicola* a vários fungicidas, como os benzimidazóis (inibição da biossíntese de tubulinas), dicarboximidas, N-phenylcarbamates e estrobilurinas (inibidores de quinona oxidase – Qol) é uma das razões para o aumento da incidência dessa doença (HASAMA; SATO, 1996; DATE et al., 2004; TAKEUCHI; KUBO; ISHII, 2006; ISHII et al., 2007).

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 pelas opções limitadas de controle com fungicidas, uma vez que os benzimidazóis recomendados para o controle da mancha-alvo tem se apresentado com menor eficiência em cultivares suscetíveis (TECNOLOGIAS, 2010).

Teramoto (2008) avaliou a sensibilidade *in vitro* de isolados de *C. cassiicola*, obtidos a partir de plantas de pepino, a oito fungicidas (captan, clorotalonil, mancozeb, azoxistrobina, difeconazol, carbendazim, tebuconazol e tiofanato metílico). Os fungicidas carbendazim e o clorotalonil na dose de 1 ppm inibiram totalmente o crescimento micelial de todos os isolados, enquanto que esse efeito inibitório do crescimento micelial só foi observado para o tebuconazol e o tiofanato metílico em concentrações de 10 ppm.

O objetivo do trabalho foi comparar a DL50 de isolados de *C. cassiicola* depositados na Micoteca da Embrapa soja, coletados em diferentes anos e locais, com a DL50 de isolados da safra 2010/11, para os fungicidas carbendazim e prothioconazol.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 isolados de *Corynespora cassiicola* da Micoteca da Embrapa Soja (MES) e quatro isolados obtidos de folhas de soja infectadas e coletadas de lavouras comerciais, de diferentes regiões, durante a safra 2010/11, depositados na Micoteca (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1 Identificação, local de origem e ano de coleta dos isolados de *Corynespora cassiicola*.

Identificação	Estado	Local de Origem	Ano de Coleta
MES 307	PR	Pitanga	1996
MES 310	PR	Sarandi	1997
MES 311	PR	Campo Mourão	1997
MES 312	MT	Itiquira	1997
MES 313	MT	Nova Mutum	1998
MES 317	PR	Palotina	1999
MES 318	MT	Campo Novo do Parecis	1999
MES 322	PR	Nova Ventura de São Roque	2001
MES 629	MT	Campo Verde	2007
MES 649	PR	Campo Mourão	2008
MES 646	MT	Campo Novo do Parecis	2008
MES 651	MT	Sorriso	2008
MES 667	MT	Sete Quedas	2008
MES 1027	MS	Chapadão do Sul	2008
MES 670	SP	Pirassununga	2008
MES 692		Paraguai	2008
MES 657			2008
MES 755	PR	Sertanópolis	
MES 754	MT	Sorriso	
MES 931	PR	Mauá da Serra	2011
MES 932	PR	Londrina	2011
MES 926	PR	Londrina	2011
MES 930	PR	Rolândia	2011
MES 933	MT	Deciolândia	2011

Os isolamentos foram realizados a partir de lesões foliares típicas da mancha-alvo. As folhas foram incubadas em câmara úmida em gerbox, contendo dois papéis absorventes saturados com água destilada. As folhas foram colocadas sobre duas lâminas de microscópio para que não ficassem em contato direto com os papéis absorventes evitando o apodrecimento. As folhas foram incubadas em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias, para possibilitar a esporulação do fungo sobre as lesões. Com o auxílio de uma agulha histológica previamente flambada, os conídios do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo

meio de cultura BDA. As placas de Petri foram incubadas em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas para possibilitar o crescimento da colônia do fungo.

Para realizar o cálculo das DL50, utilizou-se os fungicidas carbendazim e protioconazol nas concentrações de 0, 0,5, 1, 10, 100 e 1000 ppm. Para isso foram preparadas soluções estoques de 1000 ppm, de cada fungicida e diluições seriadas até obter as concentrações requeridas. Os fungicidas foram incorporados ao meio BDA fundente e o meio de cultura vertidos em placas de Petri (20 mL por placa). As placas controle sem fungicida (0 ppm) continham apenas meio de cultura BDA.

Discos de micélio de 6 mm de diâmetro de cada um dos isolados de *C. cassiicola* foram retirados das bordas das colônias com aproximadamente 10 dias de idade e transferidos para as placas com meio de cultura (com e sem fungicida). Foram realizadas quatro repetições por tratamento, cada placa correspondendo a uma repetição, adotando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado.

As placas foram incubadas em BOD por dez dias, na temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, determinando o crescimento micelial em medições radiais da colônia do fungo em dois eixos e posteriormente obtida a média entre os eixos. Com esses dados foi determinado o índice de redução do crescimento micelial (IR%), que estabelece a relação percentual entre o crescimento de cada isolado em relação à testemunha. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). A porcentagem de controle de cada fungicida foi calculada conforme a equação, $PC=100(1-X_{ij})/ X_{\max}(\text{test})$, onde PC é a porcentagem de controle, X_{ij} é o crescimento micelial observado na concentração i da repetição j , $X_{\max}(\text{test})$ é o crescimento micelial máximo observado no tratamento testemunha. Os dados foram linearizados através da função logaritmo da porcentagem de controle, na base 10. As estimativas das doses letais (DL50) foram obtidas pelo modelo de regressão probit Proc Probit, do sistema SAS® Versão 9.1.3.

A redução da sensibilidade (RS) de um isolado foi medido pelo fator de sensibilidade (FS), sendo calculado pela divisão entre a DL50 para o isolado suspeito de ter a sensibilidade alterada pela DL50 do sensível. Se o fator de sensibilidade (FS) for 1, a sensibilidade está sem alteração e sendo maior que 1 indica que está havendo redução na sensibilidade (REIS; REIS; CARMONA, 2010). Para o cálculo do FS, foi utilizada a DL50 de um isolado sensível para cada grupo

químico (triazol e benzimidazol). Foi considerado sensível o isolado com o menor valor da DL50, coletado em 1997, data anterior a recomendação para controle químico da mancha-alvo.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 24 isolados testados *in vitro*, na concentração de 0,5 ppm, o MES 311 (Campo Mourão, PR, 1997) foi o que apresentou-se mais sensível ao protioconazol, com índice de redução do crescimento micelial (IR%) de 62,23%, e o isolado MES 646 (Campos Novos Parecis, MT, 2008) apresentou-se mais sensível ao carbendazim, com IR de 100% (Tabela 4.2.). Para alguns isolados submetidos a dose de 0,5 ppm, o protioconazol e o carbendazim apresentaram baixo índice de redução, sendo até ineficientes em reduzir o crescimento, no entanto, com exceção do MES 307, os isolados que não tiveram o crescimento reduzido foram coletados em anos posteriores a 2007.

Tabela 4.2 Porcentagem de inibição do crescimento micelial *in vitro* de 25 isolados de *Corynespora cassiicola* obtidos de soja, submetidos aos fungicidas protioconazol (Prot.) e carbendazim (Carb.) na concentração de 0, 5, 1, 10, 100 e 1000 ppm.

Isolados	Dose Fungicida									
	0,5 ppm		1 ppm		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
	Prot	Carb	Prot	Carb	Prot	Carb	Prot	Carb	Prot	Carb
307	15,8 c	-4,5 f	47,4 c	11,9 h	59,7 c	49,7 c	100 a	100 a	100 a	100 a
310	10,4 d	27,2 d	40,5 d	64,6 d	60,4 c	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
311	62,2 a	18,8 d	56,1 c	47,0 e	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
312	29,2 c	34,8 c	49,2 c	82,4 b	59,8 c	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
313	19,1 c	35,5 c	37,9 d	36,4 f	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
317	26,6 c	35,3 c	73,4 b	94,5 a	80,7 b	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
318	12,9 d	76,9 b	71,4 b	96,0 a	76,9 b	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
322	28,1 c	27,4 d	37,3 d	73,6 c	46,9 d	99,3 a	100 a	100 a	100 a	100 a
629	20,6 c	15,8 e	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
649	33,7 c	86,8 b	43,9 d	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
646	43,1 b	100 a	51,2 c	100 a	63,5 c	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
651	25,4 c	12,8 e	45,7 c	22,0 g	84,4 b	25,6 e	100 a	30,4 d	100 a	38,5 c
667	8,5 d	25,4 d	35,1 d	56,4 d	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
1027	34,6 c	7,7 e	54,4 c	10,4 h	100 a	27,0 e	100 a	36,9 c	100 a	52,7 b
670	2,5 d	39,0 c	10,4 f	54,8 d	49,9 d	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
692	-0,3 e	8,8 e	8,9 f	57,8 d	18,8 f	100 a	49,8 d	100 a	100 a	100 a
657	21,8 c	20,9 d	29,3 e	61,9 d	66,9 c	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
755	-5,3 e	7,2 e	6,1 f	23,1 g	31,5 e	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
754	-8,7 e	17,6 d	4,9 f	37,2 f	31,3 e	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
931	23,5 c	23,3 d	35,2 d	33,6 f	41,4 e	42,6 d	100 a	52,4 b	100 a	52,4 b
932	16,9 c	11,5 e	24,9 e	19,2 g	25,7 f	67,1 b	52,5 d	100 a	100 a	100 a
926	10,9 d	-12,5 f	22,3 e	50,1 e	66,0 c	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
930	-12,7 e	11,1 e	3,9 f	6,4 h	36,0 e	4,3 f	100 a	16,8 e	100 a	17,0 d
933	25,3 c	14,4 e	23,5 e	23,9 g	39,3 e	25,7 e	55,4 c	41,3 c	100 a	51,8 b
CV	56,8	32,6	20,2	16,7	9,7	4,9	2,0	3,7		3,38
(%)										

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na concentração de 1 ppm o fungicida carbendazim inibiu totalmente o crescimento micelial dos isolados MES 646, MES 649 e MES 629, sendo que o protioconazol também inibiu totalmente o crescimento micelial do isolado MES 629,

de Campo Verde, MT, coletado em 2007 (Tabela 4.2.). Na concentração de 10 ppm, o produto protioconazol inibiu totalmente o crescimento de 24% dos isolados e o carbendazim de 64% dos isolados de *C. cassiicola* testados. Com 100 ppm, a maioria dos isolados tiveram o crescimento micelial totalmente inibido por ambos os produtos testados. Apenas na concentração de 1000 ppm, o protioconazol foi capaz de inibir o crescimento de todos os isolados, enquanto que para o carbendazim, alguns isolados continuaram crescendo (24% dos isolados).

Avozani (2001), testando a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* da soja a fungicidas *in vitro*, também observou a perda da sensibilidade de isolados de mancha-alvo (19/MS e 21/MS) ao produto carbendazim, sendo que esses isolados não apresentaram nenhuma resposta a esse ingrediente ativo.

Teramoto (2008) testando controle químico *in vitro* para mancha-alvo do pepino, verificou que na concentração de 100 ppm os produtos difenoconazole, tebuconazole e mancozeb proporcionaram os melhores resultados, inibindo totalmente o crescimento micelial de alguns isolados do fungo. Nessa mesma concentração, somente os produtos clorotalonil, tiofanato metílico e carbendazim não foram capazes de inibir o crescimento de todos os isolados. Na concentração de 1000 ppm o único produto capaz de inibir totalmente o crescimento micelial de todos os isolados do fungo *C. cassiicola* foi o tebuconazol, porém não diferiu estatisticamente do difenoconazol, mancozeb e captan. O fungicida tiofanato metílico apresentou o pior desempenho entre os produtos, mesmo em altas concentrações, sendo até mesmo ineficiente em inibir o crescimento micelial de dois dos isolados testados (PESP01 e PESP02). A autora observou que os produtos clorotalonil, captan, tiofanato metílico e carbendazim proporcionaram as menores porcentagens de inibição em todos os isolados.

Date et al. (2004) testando a sensibilidade de 193 isolados de *C. cassiicola* de pepino, com o método da mínima concentração inibitória (MCI), concluíram que 29 isolados eram altamente resistentes ao tiofanato metílico e ao diethofencarb e um isolado resistente ao azoxystrobin. Esse resultado deve-se provavelmente ao fato do fungicida tiofanato metílico pertencer ao grupo dos benzimidazóis, sendo a resistência desenvolvida pelo patógeno em função do uso desse tipo de fungicida em aplicações frequentes (DELEN; TOSUN, 2004).

Resultado semelhante ao do carbendazim foi encontrado por Hasama (1991), que concluiu que a efetividade dos fungicidas benzimidazóis contra

a doença tem diminuído. Para tanto, testou a sensibilidade de 419 isolados de *C. cassiicola*, coletados em campos de pepino, a benomil e carbendazim, verificando que 330 foram altamente resistentes a valores maiores que 100 ppm.

Os valores da DL50 encontrados para o protioconazol variaram de 0,47 ppm a 26,44 ppm (Figura 4.1 - A). A média do valor da DL50 para o protioconazol foi 5,03 ppm. O isolado MES 311 (Campo Mourão, PR), coletado em 1997 foi o mais sensível (Figura 4.2) e o isolado MES 1027 (Chapadão do Sul, MS) coletado em 2007 foi o menos sensível.

Figura 4.1 Distribuição dos valores da DL50 e seus respectivos limites inferior e superior de sensibilidade ao protioconazol (A) e ao carbendazim (B) dos isolados de *Corynespora cassiicola* de várias regiões produtoras de soja no Brasil.

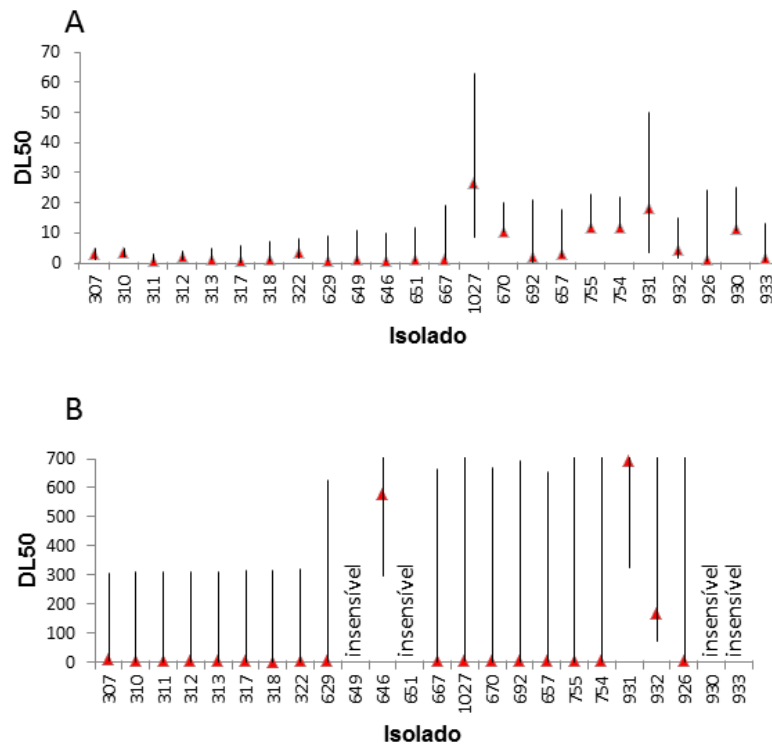
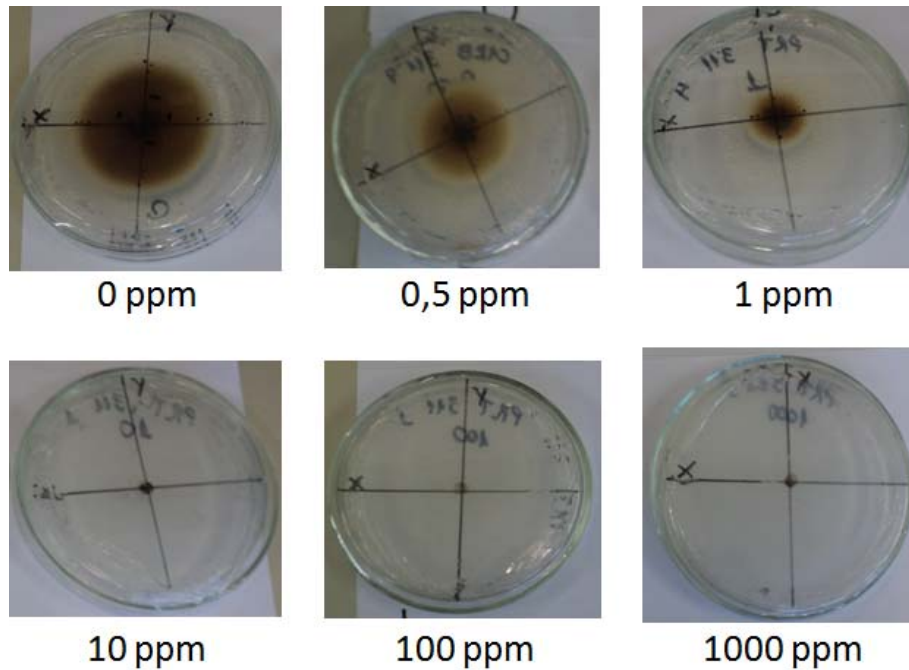


Figura 4.2 Crescimento micelial de *Corynespora cassicola* - Isolado MES 311, coletado em 1997, em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida protioconazol.



Os valores da DL50 dos isolados de *C. cassicola* submetidos a doses do carbendazim variaram de 0,30 ppm a 691,19 ppm (Figura 4.1 - B). A média do valor da DL50 para o carbendazim foi 72,79 ppm. O isolado MES 318 (Campo Novos Parecis, MT), coletado em 1999 foi mais sensível (Figura 4.3) ao carbendazim e o menos sensível foi o isolado MES 931 (Mauá-da-Serra, PR), coletada em 2011 (Figura 4.4).

Figura 4.3 Crescimento micelial de *Corynespora cassicola* - Isolado MES 318, coletado em 1999, em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida carbendazim.

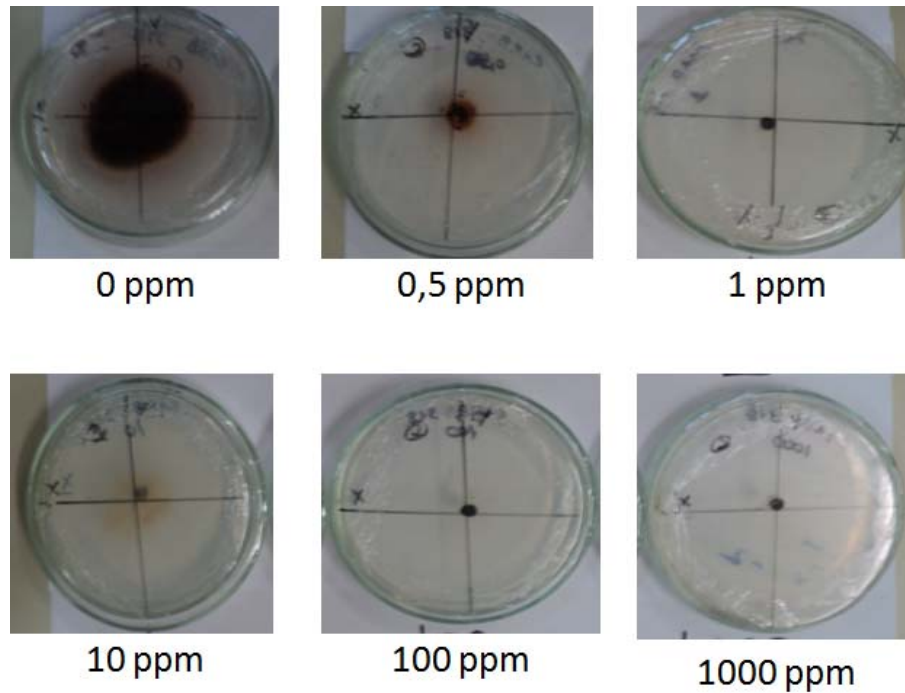
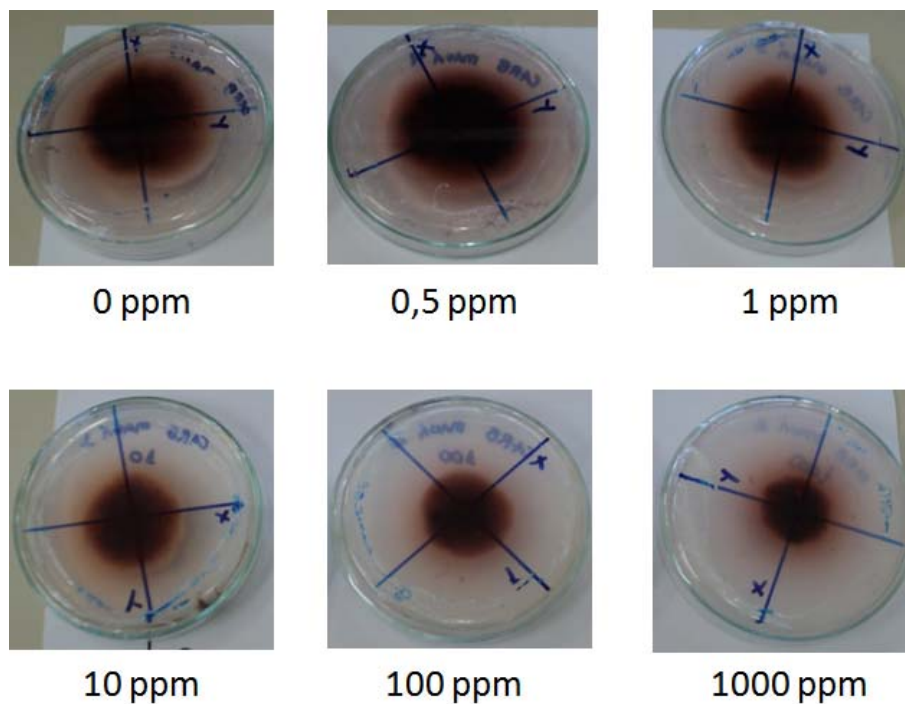


Figura 4.4 Crescimento micelial de *Corynespora cassicola* - Isolado MES 931, coletado em 2011, em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida carbendazim.



Para os isolados MES 649 (Campo Mourão, PR, coletado em 2008), MES 651 (Sorriso, MT, coletado em 2008), MES 933 (Deciolândia, MT, coletado em

2011) e MES 30 (Rolândia, PR, coletado em 2011) não foi possível estimar a DL50, quando submetidos ao produto carbendazim, por causa do crescimento do fungo na dose máxima (1000 ppm), sendo esses considerados insensíveis ao carbendazim (Figura 4.4). A insensibilidade de isolados de *C. cassiicola* proveniente do estado do Mato Grosso do Sul, submetidos ao produto carbendazim, também foi observado por Avozani (2011) que encontrou valor do fator de redução de sensibilidade maior que 200 vezes para três dos isolados testados (05/MS, 19/MS e 21/MS).

Avozani (2011) testando fungicidas para o controle *in vitro* de *C. cassiicola*, obteve valores da DL50 para o fungicida carbendazim variando de 0,2 ppm a 40 ppm, para os triazóis os valores da DL50 variaram de 9,21 ppm a 20,32 ppm, 1,89 ppm a 2,80 ppm, 0,77 ppm a 2,18 ppm e 2,25 ppm a 2,91 ppm, respectivamente para o ciproconazol, tebuconazol, flutriafol e epoxiconazol. Os valores obtidos pela autora se aproximam dos valores obtidos no presente trabalho, sendo que a autora também não verificou perda da sensibilidade dos isolados aos fungicidas do grupo químico dos triazóis, e sim redução da sensibilidade para alguns isolados de *C. cassiicola*, e encontrou isolados insensíveis ao fungicida do grupo químico dos benzimidazóis. A alteração na sensibilidade de fungos aos fungicidas DMIs é um fenômeno quantitativo (GHINI; KIMATI, 2000; REIS; REIS; CARMONA, 2010), caracterizando-se por redução gradativa da eficácia, eventualmente recuperada pelo uso de doses mais elevadas.

O fator de redução da sensibilidade (FRS) é uma ferramenta útil para quantificar a alteração da sensibilidade de um fungo a um fungicida (GHINI; KIMATI, 2000; REIS; REIS; CARMONA, 2010).

Os valores da DL50 dos isolados de referência (sensíveis), para o cálculo do FRS foi de 0,47 ppm para o protioconazol, obtido do isolado MES 311, coletado em Campo Mourão, no PR, em 1997; e 0,61 ppm para o carbendazim, obtido do isolado MES 312, coletado em Itiquira, MT, em 1997 (Tabela 4.3.).

Tabela 4.3. Isolados e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassicola* para o fungicida protioconazol e carbendazim.

Isolados	Fator de Redução da Suscetibilidade	
	Protioconazol	Carbendazim
307	6	13
310	7	1
311	1	2
312	4	1
313	3	2
317	2	1
318	3	0
322	7	1
629	1	1
649	2	Insensível
646	2	937
651	2	Insensível
667	3	1
1027	56	7
670	22	1
692	4	1
657	6	1
755	25	3
754	25	2
931	38	1127
932	9	269
926	2	2
930	23	Insensível
933	3	Insensível

Para o protioconazol o FRS variou de 1 a 56 e para o carbendazim variou de 0 a 1127 sendo necessário aumentar 56 e 1127 vezes a concentração do ingrediente ativo, respectivamente para o protioconazol e carbendazim, para reduzir em 50% a inibição do crescimento micelial.

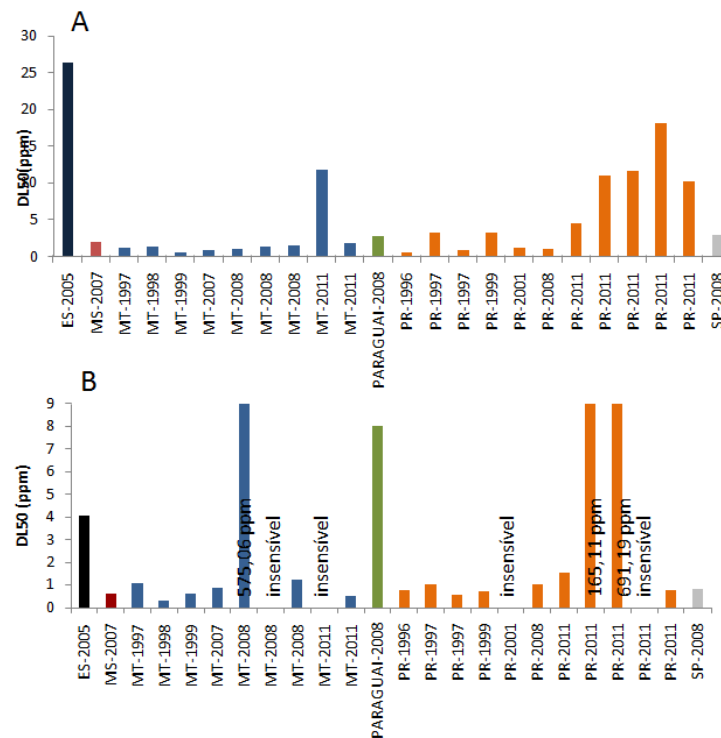
Apenas o isolado 629 (Campo Verde, MT, coletado em 2007) foi considerado sensível ao protioconazol, de acordo com o FRS ($FRS < 1$), enquanto que para o carbendazim dez dos isolados utilizados foram considerados sensíveis, sendo estes o MES 310, MES 312, MES 317, MES 318, MES 322, MES 629, MES 657, MES 667, MES 670 e MES 692.

Edgington, Khew e Barron (1971) classificaram os fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis em quatro categorias de fungitoxicidade e sensibilidade *in vitro*: i) $DL50 < 1$ ppm: alta fungitoxicidade e sensibilidade; ii) $DL50 1 - 10$ ppm: moderada fungitoxicidade e sensibilidade; iii) $DL50 10 - 50$ ppm: baixa fungitoxicidade e sensibilidade; e iv) $DL50 > 50$ ppm: não fungitóxico e insensibilidade ao fungicida. De acordo com esta classificação o produto carbendazim apresentou alta fungitoxicidade, moderada fungitoxicidade e não fungitóxico para 46%, 25% e 29% dos isolados testados, respectivamente.

Os isolados de *C. cassiicola* foram separados em três classes dependendo da sua sensibilidade ao protioconazol (IACOMI-VASILESCU et al., 2004), sendo 25% dos isolados sensíveis (valores da $DL50$ entre 0,1 e 1 ppm) 50% dos isolados ligeiramente resistentes (valores da $DL50$ entre 1 e 10 ppm) e 25% dos isolados medianamente resistentes (valores da $DL50$ entre 10 e 100 ppm).

De maneira geral, pode-se observar, para cada estado brasileiro avaliado, que para os isolados coletados em anos mais recentes, houve tendência de redução da sensibilidade, tanto para o protioconazol quanto para o carbendazim (Figura 4.5). Os isolados coletados em 1997, ano anterior a recomendação de produtos químicos para o controle da mancha-alvo, obtiveram os menores valores da $DL50$. A exceção foi o isolado MES 307 (Pitanga, PR, coletado em 1996) que apresentou $DL50 8,08$ ppm quando submetido ao carbendazim, provavelmente por já haver populações de *C. cassiicola* resistentes, devido ao uso do carbendazim em outras culturas também hospedeiras do fungo.

Figura 4.5 Distribuição dos valores da DL50, dos isolados de *Corynespora cassiicola* da soja de estados brasileiros em diferentes anos de coleta, submetidos ao protoconazol (A) e ao carbendazim (B).



Os valores da DL50 acima de 50 ppm, que representa insensibilidade ao fungicida, foram obtidas nos isolados coletados a partir do ano 2007, sendo a insensibilidade ao fungicida observada apenas para o produto carbendazim. Portanto, pode-se observar que ao longo do tempo houve perda de sensibilidade do fungo, com seleção para populações de *C. cassiicola* menos sensíveis aos grupos químicos testados.

Um dos primeiros relatos da redução da sensibilidade com o uso de benzimidazóis em fungos do gênero *Corynespora* foi verificado por Hasama em 1991 na cultura de pepino. Entre os 419 isolados testados, quanto à sensibilidade dos fungicidas benomil e carbendazim, 330 foram altamente resistentes a esses produtos. Esses resultados indicam que a ocorrência de linhagens resistentes, se deve, principalmente ao uso recorrente desses produtos desde 1973. O mesmo autor relata que não existiu diferença morfológica entre os isolados sensíveis e os resistentes a esses fungicidas (HASAMA, 1991).

A detecção da redução da sensibilidade de *C. cassiicola* a fungicidas também foi encontrada na cultura do tomate, em Okayama, no Japão, Date et al.

(2004) comprovaram a redução da fungitoxicidade de fungicidas benzimidazóis e a existência de populações de *C. cassiicola* resistentes a esse grupo químico.

A sensibilidade *in vitro* de isolados de *C. cassiicola* obtidos da cultura de soja, acerola, algodão e café foram determinados para diversos fungicidas. O carbendazim a 1 ppm, inibiu totalmente o crescimento miceliano de todos os isolados. Já o fungicida tebuconazol inibiu o crescimento apenas para os isolados de soja e café (TERAMOTO; SALVAIA; MARTINS, 2005).

Teramoto (2008) relata que o fungicida carbendazim teve pouca eficiência no controle da mancha-alvo em pepino, o que pode ser resultado do surgimento de resistência por parte do patógeno. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no presente trabalho para os sete isolados de *C. cassiicola* (MES 646, MES 649, MES 651, MES 931, MES 932, MES 930 e MES 933) que mostraram-se insensíveis ao carbendazim.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a falha de controle da mancha-alvo, observada nas últimas safras, poderia ser atribuída à redução ou perda da sensibilidade de uma linhagem aos produtos químicos utilizados ao longo dos anos, pois os isolados que apresentaram os maiores valores da DL50 foram coletados após o ano de 2007.

Os resultados de experimentos *in vitro* servem de embasamento para trabalhos *in vivo*, embora possam diferir entre si, uma vez que as moléculas dos fungicidas no meio de cultura atuam de uma forma sobre o patógeno e na superfície das plantas ou internamente podem agir de outra.

A comparação do controle químico da mancha-alvo do pepino *in vitro* e *in vivo*, foi realizada por Teramoto (2008) que concluiu que os resultados obtidos *in vitro* não tiveram correlação com os *in vivo*, uma vez que os fungicidas mais eficientes *in vitro* foram o tebuconazol, difenoconazol, mancozeb e captan, e o mais eficiente *in vivo* foi o azoxystrobin. Apenas para os benzimidazóis os resultados foram similares, sendo bastante ineficientes no controle de *C. cassiicola in vitro* como *in vivo*. Os fungicidas tiofanato metílico e carbendazim tiveram pouca eficiência no controle da mancha-alvo, o que pode, provavelmente, ser resultado do surgimento de resistência por parte do patógeno, uma vez que esses dois produtos pertencem ao grupo químico dos benzimidazóis, grupo de alto risco de resistência (GHINI; KIMATI, 2000; DELEN; TOSUN, 2004).

Embora alguns dos fungicidas comumente utilizados na cultura da soja, do grupo dos benzimidazóis, dos triazóis e das estrobilurinas, apresentem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle dessa doença, não tem sido observada eficiência satisfatória no campo (GODOY et al., 2011). As menores porcentagens de controle foram observadas para os tratamentos com benzimidazóis, apresentando, no entanto, severidade inferior à testemunha. Os fungicidas do grupo dos benzimidazóis, amplamente utilizados no campo para controle da mancha-alvo, apresentaram eficiência inferior aos outros produtos testados. Os produtos com maior eficiência nos ensaios não possuem registro no MAPA até o momento (GODOY et al., 2011).

4.5 CONCLUSÃO

Os valores obtidos para DL50 sugerem a seleção de isolados resistentes a benzimidazóis ao longo do tempo. Foi observada redução da sensibilidade de isolados de *C. cassicola* ao produto prothioconazol e perda da sensibilidade dos isolados MES 646, MES 649, MES 651, MES 931, MES 932, MES 930 e MES 933 ao produto carbendazim.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que dos quatro triazóis testados para controle da ferrugem-asiática da soja, o protioconazol apresentou menores valores da DL50, sendo as populações de *P. pachyrhizi* sensíveis a esse produto, e os valores da DL50 obtidos no ensaio de *C. cassicola* sugerem a seleção de isolados resistentes a benzimidazóis ao longo do tempo. Foi observada redução da sensibilidade de isolados de *C. cassicola* ao produto protioconazol e perda da sensibilidade dos isolados MES 646, MES 649, MES 651, MES 931, MES 932, MES 930 e MES 933 ao produto carbendazim.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUL-HAYJA, Z.; WILLIAMS, P. H. Disease handbook – **Target leaf spot (*Corynespora cassicola*)** 2011. Disponível em: <<http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/cuke/dshndbk/tls.html>>. Acesso em: 17 jun. 2011.
- ALEXOPOLUS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**, New York: John Willey e Sons, 1996.
- ALMEIDA, A. M. R.; MACHADO, C. C.; FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ANTONIO, H. Ocorrência de *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 111-112, 1976.
- ALMEIDA, A. M. R.; YAMASHITA, J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 3, p. 203-206, 1976.
- ALMEIDA, A. M. R. Influência do pH sobre crescimento e esporulação de *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei em meio de batata-dextrose-ágar em diferentes períodos de incubação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 175-177, 1977.
- ALMEIDA, A. M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; ABDELNOOR, R. V.; YORINORI, J. T.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Diferenciação de isolados de *Corynespora cassicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 316, 1994. Suplemento.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja. In: KIMATI, H. AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p. 569-588.
- ALVES, M. L.; LOURD, M.; NODA, H. Ocorrência de *Corynespora cassicola* em caráter epidêmico em tomates em Manaus – AM. In: CONGRESSO BRASILEIRO DEFITOPATOLOGIA, 18., 1985, Fortaleza. **Resumos...** Brasília: SBF, 1985. p. 229.
- ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. (2006) Influência das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. In: Zambolim, L. (Ed.). **Ferrugem-asiática da soja**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda. 2006. p. 37-59.
- 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.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE SOJA. Santa Cruz do Sul, 2006. p. 136.
- AVALHAES, T. A.; MACHADO, A. Q.; CASSETARI, D.; MELLO, A. C. T.; MOURA, T. A.; PINHO, R. A. Controle químico de mancha-alvo em soja em Mato Grosso. **Tropical Plant Pathology**, Cuiabá, v. 35, p. 115, 2010. Suplemento.

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

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

AZEVEDO, L. A. S.; JULIATTI, F. C.; BALARDIN, R. S.; SILVA, O. C. **Programa Syntinela: Monitoramento da dispersão de *Phakopsora pachyrhizi* e alerta contra a ferrugem-asiática da soja**. Campinas: Emopi Gráfica e Editora, 2004.

BALARDIN, R. S. Ferrugem-asiática da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 18, ago. 2004. Suplemento.

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.

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

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

BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia comparativa: ferrugem da soja e outras doenças. In: Zambolim, L. (Org.) **Ferrugem-asiática da soja**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2006. p. 15-35.

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

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

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

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

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

- BROMFIELD, K. R. **Soybean rust**. American Phytopathological Society. Saint Paul, p. 65. 1984.
- 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.
- BUZZERIO, N. F.; BASSO, M. E.; LACHI, G. B.; LOVATO, B. V.; GONÇALVES, F. A.; PAIVA, S. B. Determinação de metodologia para produção de inóculo de *Phakopsora pachyrhizi* em condições de laboratório para fins de estudos de sensibilidade. XXX Congresso Paulista de Fitopatologia. **Resumos**, v. 33, p. 61, 2007.
- CALDWELL, P.; LAING, M. **Soybean rust – A new disease on the move**. 2002. Disponível em: <http://www.saspp.org/archived_articles/PatCaldwellJan2002.php>. Acesso em: 17 de jun. 2011.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C.V. SASM – Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 2, p. 18–24, 2001.
- CONAB. COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safras-grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra>> Acesso em: 17 jun. 2012.
- CUTRIM, F. A.; SILVA, G. S. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 193-194, 2003.
- DATE, H.; KATAOKA, E.; TANINA, K.; SASAKI, S.; INOUE, K.; NASU, H.; KASUYAMAM, S. Sensitivity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of *Corynespora* leaf spot of cucumber, to tiphanate-methyl, diethofencarb and axozystrobin. **Japan Journal of Phytopathology**, Tokyo, v. 70, n. 1, p. 10-13, 2004.
- DEKKER, J. The fungicide resistance problem: Will it grow worse? **EPPO Bulletin**, v. 15, p. 337-334, 1985.
- DEL PONTE, E. M.; GODOY, C. V.; LI, X.; YANG, X. B. Predicting severity of Asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models. **Phytopathology**, v. 96, p. 797-803, 2006.
- DELEN, N.; TOSUN, N. Fungicidas: modo de ação e resistência. Parte 2. **RAPP**, Passo Fundo: RAPP Ltda, v. 12, p. 27-90, 2004.
- DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; PRABHU, A. S. Uma nova enfermidade foliar no cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3, p. 259-265, 1978.
- DUARTE, M. L. R.; ASANO, S.; ALBUQUERQUE, F. C. Estudo comparativo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassiicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 205-214, 1983.

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

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

FORCELINI, C. A.; REIS, E. M.; GASSEN, F.; YORINORI, J. T.; HOFFMAN, L.; COSTAMILAN, L.; SILVA, O. C.; BALARDIN, R.; CASA, R. T. **Doenças na cultura da soja**: Série Técnica, v. 1. 2004.

FURLAN, S. H.; SCHERB, C. Formulações de tebuconazol quanto à eficiência no controle da ferrugem-asiática da soja. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 29, 2007.

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, 1982. 24-31 p.

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

GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Escala diagramática para avaliação da ferrugem da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 63-68, 2006.

GODOY, C. V.; PIMENTA, C. B.; MIGUEL-WRUCK, D. S.; RAMOS JUNIOR, E. U.; SIQUERI, F. V.; FEKSA, H. R.; DOS SANTOS, I.; LOPES, I. O. N.; NUNES JUNIOR, J.; ITO, M. A.; IAMAMOTO, M. M.; ITO, M. F.; MEYER, M. C.; DIAS, M.; MARTINS, M. C.; ALMEIDA, N. S.; ANDRADE, N. S.; ANDRADE, P. J. M.; SOUZA, P. I. M.; BALARDIN, R. S.; BARROS, R.; SILVA, S. A.; FURLAN, S. H.; GAVASSONI, W. L. (2007). **Eficiência de fungicidas para controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2006/07**. Resultados sumarizados dos ensaios em rede. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 42).

GODOY, C. V.; SILVA, L. H. C. P.; ULTIMADA, C. M.; SIQUERI, F. V.; LOPES, I. O. N.; ROESE, A. D.; MACHADO, A. Q.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; NUNES JUNIOR, J.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D. S.; FORNAROLLI, D. A.; MIGUEL-WRUCK, D. S.; RAMOS JUNIOR, E. U.; BORGES, E. P.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; CAMPOS, H. D.; NUNES JUNIOR, J. R. C.; COSTAMILAN, L. M.; CARNEIRO, L. C.; SATO, L. B.; CANTERI, M. G.; ITO, M. A.; IAMAMOTO, M. M.; ITO, M. F.; MEYER, M. C.; COSTA, M. J. N.; DIAS, M. D.; MARTINS, M. C.; LOPES, P. V. L.; SOUZA, P. I. M.; BARROS, R.; BALARDIN, R. S.; IGARASHI, S.; SILVA, S. A.; FURLAN, S. H.; CARLIN, V. J. **Eficiência de fungicidas para controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2008/09**. Resultados sumarizados dos ensaios em rede. Londrina: Embrapa Soja, 2009. 12 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 69).

GODOY, C. V.; ULTIMADA, C. M.; SILVA, L. H. C. P.; SIQUERI, F. V.; HENNING, A. A.; ROESE, A. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; FILHO, D. S. J.; RAMOS JUNIOR, E. U.; BORGES, E. P.; DEL PONTE, E. M.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; CAMPOS, H. D.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, J. R. C.; COSTAMILAN, L. M.; LUCAS, N.; CARNEIRO, L. C.; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.;

ITO, M. A.; CUNHA, M. G.; ITO, M. F.; MEYER, M. C.; MELO, R. A. C.; BALARDIN, R. S.; IGARASHI, S.; SILVA, S. A.; FURLAN, S. H.; NORA, T. D.; CARLIN, V. J. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2010/11: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Londrina: Embrapa Soja, 2011. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 87).

GODOY, C. V.; ULTIMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; PIMENTA, C. B.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; MADALOSSO, M.; VOLF, M. R.; BARROS, R.; BALARDIN, R. S.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; **Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassicola*, na safra 2011/12: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Londrina: Embrapa Soja, 2012. 6 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 94).

GODOY, C. V.; ULTIMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; ROESE, A. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; HENNING, F. A.; FEKSA, H. R.; NUNES JUNIOR, J.; COSTAMILAN, L. M.; CARNEIRO, L. C.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; ITO, M. F.; BARROS, R.; BALARDIN, R. S.; SILVA, S. A.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; BARROS, V. L. P.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2011/12: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Londrina: Embrapa Soja, 2012. (Embrapa Soja. Circular Técnica 97).

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

HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FEDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 6, p. 664-666, 2005. Suplemento.

HASAMA, W. Occurrence and characteristics of resistant strains of *Corynespora melonis* against benzimidazole compounds. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 57, n. 3, p. 312-318, 1991. (Resumos).

HASAMA, W.; SATO, M. Occurrence and distribution of fungicide-resistant field isolates of *Corynespora cassicola*, causal fungus of target leaf spot of cucumber, in Kyushu and Okinawadistricts. **Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu**, v. 42, p. 26-30, 1996.

HENNINGS, V. P. A few new Japanese Uredinaceae. **Hedwigia**, v. 42, p. 107-108, 1993.

IACOMI-VASILESCU, B.; AVENOT, H.; BATAILLÉ-SIMONEAU, N.; LAURENT, E.; GUÉNARD, M.; SIMONEAU, P. In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 23, p. 481-488, 2004.

IAMAMOTO, M. M. Variabilidade de tebuconazol no controle da ferrugem-asiática da soja. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 82, 2007.

ISARD, S. A.; DUFAULT, N. S.; MILES, M. R.; HARTMAN, G. L.; RUSSO, J. M.; DE WOLF, E. D.; MOREL, W. The effect of solar irradiance on the mortality of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 7, p. 941-945, 2006.

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

JACCOUD-FILHO, D. S.; PASSINI, F. B.; DABUL, A. N. G.; GRANADO, C. J. F.; FIGUEIREDO, M. B. Alternative hosts of the agent of the asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 60-64, ago. 2007. Suplemento.

KAWUKI, R. S.; ADIPALA, E.; TUKAMUHABWA, P. Yield loss associated with soya bean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. **J. Phytopathology**, v. 151, p. 7-12, 2003.

KINGSLAND, G. C. Pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* in the Republic of Seychelles. **Tropical Pest Management**, London, v. 32, n. 4, p. 283-287, 1986.

KITANI, K.; INOUE, Y. Studies on the soybean rust. **Bull. Shikoku Agric. Exp. Stn.** (Zentsuji, Japan), v. 5, p. 319-342, 1960.

KOCH, E.; EBRAHIM-NESBAT, F. B.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Journal of Phytopathology**, St. Paul, v. 106, p. 302-320, 1983.

KOCHMAN, J. K. Effect of temperature on development of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 30, p. 273-277, 1979.

KOGA, L. J.; LOPES, I. O. N.; GODOY, C. V.; Resultado de monitoramento da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas. **Resumos da Reunião do Consórcio Antiferrugem**, p. 59-69, 2009.

KÖLLER, W.; SCHEINPFLUG, H. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. **Plant Disease**, v. 71, n. 12, p. 1066-1074, 1987.

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

KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das Cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia** - Doenças das Plantas Cultivadas. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, 2005. p. 293-302.

LEVY, C. Epidemiology and chemical control of soybean rust in southern Africa. **Plant Disease**, v. 89, p. 669-674, 2005.

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.

LOPES, I. O. N.; OLIVEIRA, M. C. N. Transformação proibit: um exemplo de análise em dados de dose resposta. Disponível em:<<http://www.posgraduacao.ufla.br/gauss/congresso/11seagro/conteudo/arquivos/161.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2011.

MARCHETTI, M. A.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by urediospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v. 66, p. 461-463, 1976.

MARTINS, M. C.; FISCHER, I. H.; VEIGA, J. S.; LOURENÇO, S. A. Ocorrência da mancha-alvo causada por *Corynespora cassiicola* em pepino (*Cucumis sativus*) no Brasil.In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia. **Resumos...** Brasília: SBF, 2003. 208 p.

MEHL, A. *Phakopsora pachyrhizi*: sensitivity monitoring and resistance management strategies for DMI and QoI fungicides. In: V Congresso Brasileiro de Soja, Mercosoja, 2009, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Soja. CD, 2009.

MELLO, M. M. **Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo – RS, 2009.

MILES, M. R.; LEVY, C.; MOREL, W.; MÜELLER, T.; STEINLAGE, T.; VAN RIJ, N.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. International fungicide efficacy trials for the management of soybean rust. **Plant Disease**, v. 91, n. 11. p. 1450-1458, 2007.

MOREL, W. **Roya de la soja**. Comunicado técnico – Reporter oficial: Serie Fitopatológica, n. 1, junho. 2001. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Subsecretaría de Agricultura. Dirección Agrícola. Centro de Investigación Agrícola (CRIA) Capitán Miranda, Itapúa, Paraguay.

MOREIRA, E. N.; COSTA, M. J. N.; WAGNER, J. R. A.; RIBOLI, E.; CASONATTO, A.; LUPATINI, F. Momento, número de aplicações e desenvolvimento de fungicidas no controle da mancha-alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, Cuiabá, v. 35, p.79, 2010. Suplemento.

NIKLAUS, J.; GRUNDWALD, N. J.; STURBAUM, A. K.; MONTES, G. R.; SERRANO, E. G.; LOZOYA-SALDANA, H.; FRY, W.E. Selection for fungicide resistance within a growing season in field populations of *Phytophthora infestans* at the Center of origin. **Phytopathology**, v. 96, p. 1397-1403, 2006.

NOJOSA, G. B.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DIPIERO, R. M.; CIA, P.;

PASCHOLATI, S. F.; RESENDE M. L.V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de Resistência em plantas a patógenos e insetos**. FEALQ, Piracicaba, SP, 2005, 263 p.

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

OGLE, H. J.; BYTH, D. E.; McLEAN, R. Effect of rust (*Phakopsora pachyrhizi*) on soybean yield and quality in South-eastern Queensland. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 30, p. 883-893, 1979.

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, S.M.A.; LARANJEIRA, D.; MENEZES, M. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* causando podridão mole em frutos de mamão, no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 32., 1999, Curitiba-PR. **Resumos...** Brasília: SBF, 1999. p. 296.

ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN, J. F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on leguminosae. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 10, p. 825-850, 1992.

PALTI, P. V.; ANAHOSUR, K. H. Control of soybean rust by fungicides. **Indian Phytopathology**. v. 51, n. 3, p. 265-268, 1998.

PERNEZNY, K.; SIMONE, G. W. **Target spot of several vegetable crops**. 1993. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/VH/VH05200.pdf>> Acesso em: 17 jun. 2011.

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

POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R.; ALFENAS, A. C.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C. Three new pathogens infecting antilles cherry in the State of Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 424-426, 2003.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; MICHEL, C. Ocorrência de epidemia da ferrugem da soja no Rio Grande do Sul na safra 2001/2002. **Fitopatologia Brasileira**. 2002. Suplemento.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R. Ferrugem da soja: revisão e aspectos técnicos. In: REIS, E. M. (Ed.) **Doenças na cultura da soja**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 2004. 55-70 p.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. **Doenças da soja: Ferrugem-asiática**. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2006. 48 p.

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

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

ROSSI, R.L. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the Province of Misiones, Argentina. **Plant Disease**, v. 87, p. 102, 2003.

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

RYTTER, J. L.; DOWLER, W. M.; BROMFIELD, K. R. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. **Plant Disease**, v. 68, p. 818-819, 1984.

SANGAWONGSE, P.; KITTISIN, S.; NUNTHAPUN, M. Chemical control of soybean rust in Thailand. **Thailand Journal Agriculture Science**, Bangkok, v. 10, n. 1, p. 1-8, 1977.

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

SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H. K. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, v.89, p. 774, 2005.

SCHERB, C. T; MEHL, A. 2006. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) - *Phakopsora pachyrhizi*: detached leaf test. Disponível em :<http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/anhang/PHAKPA_deached_leaf_monitoring_method_BCS_2006_V1.pdf>. Acesso em: 17jun. 2011.

SCHULZ, U.; SCHEINPFLUG, H. Investigations on sensitivity and virulence dynamics of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* with and without triadimenol treatment. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE, 1986, Surrey. **Pests & disease**, Surrey: Thonton Heath, 1986. p. 531-538.

SEAMAN, W. L., SHOEMAKER, R. A., PETERSON, E. A. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* on soybean. **Canadian Journal Botany**, v. 43, p. 146–1469, 1965.

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

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

SILVA, G.S.; RODRIGUES, A.A.C.; SOARES JÚNIOR, A.C. Mancha de *Corynespora* em acerola (*Malpighia glabra*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30, 1997, Poços de Caldas. **Resumos**...Brasília: SBF, 1997, p. 452.

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

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. Infectious diseases: rust. In: _____. **Compendium of soybean diseases**. 3 ed. St. Paul: APS Press, 1989. p. 24-27.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. **Soybean Rust Workshop**. Urbana, Illinois. Proceedings. 1996.

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

SLAMINKO, T. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; BONDE, M. R.; HARTMAN, G. L. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Disease**, v. 92, p. 767-771, 2008.

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.

SPENCER, J. A, WALTERS, H. J. Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 59, p. 5860,1969.

STOVOLD, G. E.; SMITH, H. J. P. The prevalence and severity of diseases in the coastal soybean crop of New South Wales. **Australian Journal of Experimental Agricultural**, v. 31, p. 545-550, 1991.

TAKEUCHI, T.; KUBO, C.; ISHII, H. Sensitivity of Chiba Prefecture isolates of *Corynespora cassiicola*, the cause of corynespora leaf spot on cucumber, to several fungicides. Annual Report of the Kanto-Tosan **Plant Protection Society**, v. 53, p. 55–60, 2006.

TECNOLOGIAS... . **Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**: Embrapa Soja, Londrina PR, 2010. 321 p.

TECNOLOGIAS de produção de soja: região central do Brasil 2009. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrado: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção)

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

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, 2005. 39 p.

TERAMOTO, A.; CAVALCANTE, P. R.; CUNHA, M. G. Primeiro relato da ocorrência de *Corynespora cassiicola* na cultura do pepino em Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39, 2006, Salvador. **Resumos...** Brasília: SBF, 2006.

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

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

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.

VERZIGNASSI, J.R.; VIDA, J.B.; TESSMANN, D.J. *Corynespora cassiicola* causando epidemias de manchas foliares em pepino 'japonês' sob estufa no norte do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 570, 2003.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 52-56, 2002.

YANG, X. B.; TSCHANZ, A. T.; DOWLER, W. M.; WANG, T. C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 81, n. 11, p. 420-1426, 1991.

YEH, C. C.; TSCHANZ, A. T.; SINCLAIR, J. B. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and other hosts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, p. 1111-1112, 1981.

YEH, C. C. Physiological races of *Phakopsora pachyrhizi* in Taiwan. **Jour. Agric. Res. 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: 17jun. 2011.

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

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

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow**. Londrina: Embrapa, 2002. Folder.

YORINORI, J. T. **Country report and rust control strategies in Brazil**. In: World soybean research conference, 7, soybean processing and utilization conferente, 4, Congresso Brasileiro da Soja, 2004.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES, J. J. R. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, p. 675-677, 2005.

ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E.; POZZA, E. A.; ARAÚJO, D.V. Germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em diferentes métodos de armazenamento. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 83-85, 2007a.

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