

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

***Cercospora* spp.: Identificação morfológica e molecular,
patogenicidade, sensibilidade a fungicidas e reação de cultivares de
soja**

Monikéli Aparecida da Silva

Passo Fundo

2022

Monikéli Aparecida da Silva

Cercospora spp.: Identificação morfológica e molecular, patogenicidade, sensibilidade a fungicidas e reação de cultivares de soja

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Agronomia.

Orientadora:
Dra. Carolina Cardoso Deuner

Passo Fundo

2022

CIP – Catalogação na Publicação

S586c Silva, Monikéli Aparecida da
Cercospora spp. [recurso eletrônico]: identificação morfológica e molecular, patogenicidade, sensibilidade a fungicidas e reação de cultivares de soja / Monikéli Aparecida da Silva. – 2022.

3.1 MB. ; PDF.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cardoso Deuner.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2022.

1. Soja – Doenças e pragas – Controle. 2. *Cercospora*.
3. Fungicidas. I. Deuner, Carolina Cardoso, orientadora. II. Título.

CDU: 633.34-2

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

"*Cercospora* spp.: Identificação morfológica e molecular, patogenicidade, sensibilidade a fungicidas e reação de cultivares de soja"

Elaborada por

Monikéli Aparecida da Silva

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

Aprovada em: 1º/04/2022
Pela Comissão Examinadora

Dra. Carolina Cardoso Deuner
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora - UPF

Dra. Flávia Mello
Examinador externo
Syngenta

Dra. Jaqueline Huzar Novakowski
Examinador interno
Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária – UPF

Dra. Nadia Canali Langaro
Coordenadora do PPGAgro

Dra. Sandra Mathioni
Examinador externo
Syngenta

Dr. Eraldo Lourenço Zanella
Diretor da Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária – FAMV/UPF

DEDICATÓRIA

A Deus, pela vida concedida, por me guiar e iluminar na minha caminhada, me dando saúde, força e coragem, para superar os momentos mais difíceis ao longo da minha vida.

Aos meus pais Joceli e Nardeli e, irmã Kássia, por todo incentivo e apoio, que nunca duvidaram da minha capacidade.

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela qualidade e excelência, pela oportunidade da realização deste estudo.

À minha orientadora Profa. Carolina Cardoso Deuner, pela confiança depositada em mim, dedicação, amizade e ensinamentos. Tenho muita admiração pela pessoa e profissional que é.

À Cinara de Andrade Cardoso, por toda a ajuda e auxílio que recebi desde a graduação até esse momento, pelos ensinamentos, pela amizade, conselhos, paciência. Você é uma pessoa maravilhosa, grata por cruzar o meu caminho.

Ao meu companheiro e amigo Amilton Sartor, pelo amor, carinho, compreensão, conselhos, por sempre se fazer presente, por me incentivar a nunca desistir e me lembrar sempre que eu sou capaz e, por toda a ajuda que recebi para a realização desta dissertação, inclusive de ir aos finais de semana me ajudar nas avaliações dos experimentos. Amo você.

A estagiária Luana Nadal, por sempre estar disposta a ajudar e a aprender, pelas risadas e pela amizade.

A Profa. Jaqueline, por sempre se dispor a me auxiliar com a estatística dos dados, pela paciência e amizade.

Aos meus amigos e colegas Maicon Balbinotti e Helena Trindade pela amizade que se estende desde a graduação, por poder contar sempre com vocês, por cada desabafo, por cada risada. Sou grata a cada um de vocês!

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por transmitir seus saberes com muito profissionalismo.

A equipe da empresa Syngenta, Sandra Mathioni, Flávia Mello, Daniel Dias Rosa e Ricardo Dejardins Antunes pela parceria.

Por fim, agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização e concretização desta dissertação. Tenho muito orgulho de tudo que conquistei profissional e pessoalmente, tenho a certeza que cheguei até onde estou pelas pessoas que cruzaram no meu caminho que ajudaram ou apoiaram de alguma maneira. Gratas a todos!

“Não tenho a menor sombra de dúvida de que qualquer pessoa, homem ou mulher, pode alcançar o que eu alcancei. Basta fazer o mesmo esforço e cultivar a mesma esperança e a mesma fé. A força não vem da capacidade física, mas de uma vontade indomável”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

SILVA, Monikéli Aparecida da. **Cercospora spp.**: identificação morfológica e molecular, patogenicidade, sensibilidade a fungicidas e reação de cultivares de soja. [118] f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2022.

A mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) são doenças da soja, comumente associadas ao fitopatógeno *Cercospora kikuchii*, mas outras espécies têm sido associadas como *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. nicotianae*. O manejo dessas doenças inclui o controle cultural e químico, sendo este último, necessário monitorar a eficiência dos fungicidas. Para o controle genético, não há evidências de cultivares resistentes, sendo necessário realizar a reação de cultivares de soja para esses fitopatógenos. Devido a importância da MPS e do CFC na cultura da soja e a escassez de informações sobre espécies de *Cercospora*, os objetivos desse estudo foram: a) identificar espécies de *Cercospora* spp. associadas a MPS e CFC, verificar a patogenicidade e quantificar a concentração de cercosporina; b) avaliar o efeito de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Cercospora cf. flagellaris*; c) determinar a concentração efetiva 50% (CE₅₀) de fungicidas triazóis (IDM), morfolina (SBI), estrobirulinas (IQe), carboxamidas (ISDH), benzimidazóis (MBC) e multissítios, e a sensibilidade de isolados de *C. cf. flagellaris* e d) determinar a reação de cultivares de soja à *C. cf. flagellaris*. No Capítulo I, os isolados de *Cercospora* spp. foram identificados morfológicamente e molecularmente, após, comprovou-se a patogenicidade em plantas e sementes de soja e, quantificou-se a concentração de cercosporina desses isolados. Logo, os 29 isolados identificados foram das espécies *C. cf. flagellaris* (69%), *C. canescens* (14%), *C. dichondrae* (7%), *C. helianthicola* (4%), *C. beticola* (3%) e *C. lagenariae* (3%). Os isolados foram patogênicos à soja, comprovando os Postulados de Koch. A concentração de cercosporina dos isolados variou de 0,001 a 0,008 nmol/mL. No Capítulo II, avaliou-se o efeito de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *C. cf. flagellaris*. Foram utilizados sete meios de cultura: BDA, PDA, AV8, ACZ, AEFS, ASS e AAV. Diante disso, o índice de velocidade de crescimento micelial e a taxa de crescimento diário, foram maiores para o meio de cultura AAV para os isolados UPF C01 e UPF C12. Os meios de cultura ACZ, AAV, AV8 e AEFS foram melhores para a esporulação dos isolados. No Capítulo III, determinou-se a CE₅₀ de fungicidas e a sensibilidade de isolados do fungo. Como resultado os fungicidas IDM apresentaram CE₅₀ de 0,014 a 63,09 mg.L⁻¹, o fungicida SBI apresentou CE₅₀ de 0,07 a 0,81 mg.L⁻¹, os fungicidas ISDH e multissítios apresentaram CE₅₀ 43,12 a >100 mg.L⁻¹, os fungicidas IQe e MBC apresentaram CE₅₀ >100 mg.L⁻¹. Os isolados de *C. cf. flagellaris* foram sensíveis aos fungicidas IDM e SBI II, moderadamente sensíveis a insensíveis para os fungicidas ISDH e multissítios e, insensíveis aos fungicidas IQe e MBC. No Capítulo IV, avaliou-se a reação de 30 cultivares de soja à *C. cf. flagellaris*, inoculadas pela aspersão da suspensão de conídios e micélio do fungo. Desse modo, a maior severidade do CFC foi nas cultivares TMG7262 (2,67%), BRS6203 (2,63%) e BRS5601 (1,75%) para o isolado UPF C01, enquanto para o isolado UPF C12, a cultivar com maior severidade foi a PIONEER 95R51 (1,83%).

Palavras-chave: 1. Mancha púrpura da semente. 2. Crestamento foliar de *Cercospora*. 3. Fungicidas. 4. Concentração efetiva 50%. 5. *Glycine max L.*

ABSTRACT

SILVA, Monikéli Aparecida da. **Cercospora spp.:** morphological and molecular identification, pathogenicity, fungicide sensitivity and reaction of soybean cultivars. [118] f. Dissertation (Masters in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2022.

Purple seed stain (PSS) and Cercospora leaf blight (CLB) are soybean diseases commonly associated with the phytopathogen *Cercospora kikuchii*, but other species have been associated such as *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* and *C. nicotianae*. The management of these diseases includes cultural and chemical methods, the latter being necessary to monitor the efficiency of fungicides. For genetic control, there is no evidence of resistant cultivars, being necessary to perform the reaction of soybean cultivars to these phytopathogens. Considering the importance of PSS and CLB in soybean crop and the scarcity of information on *Cercospora* species, the objectives of this study were: a) to identify species of *Cercospora* spp. associated with PSS and CLB, verify the pathogenicity and quantify the concentration of cercosporin; b) to evaluate the effect of culture media on mycelial growth and sporulation of *Cercospora cf. flagellaris*; c) determine the effective concentration 50% (EC₅₀) of triazole (DMI), morpholine (SBI), strobirulin (QoI), carboxamide (SDHI), benzimidazole (MBC) and multisite fungicides, and the sensitivity of *C. cf. flagellaris* isolates and d) determine the reaction of soybean cultivars to *C. cf. flagellaris*. In Chapter I, the isolates of *Cercospora* spp. were identified morphologically and molecularly, after which, the pathogenicity in soy plants and seeds was verified and the cercosporin concentration of these isolates was quantified. Thus, the 29 isolates identified were of the species *C. cf. flagellaris* (69%), *C. canescens* (14%), *C. dichondrae* (7%), *C. helianthicola* (4%), *C. beticola* (3%) and *C. lagenariae* (3%). The isolates were pathogenic to soybean, proving Koch's Postulates. The cercosporin concentration of the isolates ranged from 0.001 to 0.008 nmol/mL. In Chapter II, the effect of culture media on mycelial growth and sporulation of *C. cf. flagellaris* was evaluated. Seven culture media were used: BDA, PDA, AV8, ACZ, AEFS, ASS and AAV. As a result, the mycelial growth speed index and daily growth rate, were higher for the AAV culture medium for isolates UPF C01 and UPF C12. The culture media ACZ, AAV, AV8 and AEFS were better for the sporulation of the isolates. In Chapter III, the EC₅₀ of fungicides and the sensitivity of isolates of the fungus were determined. As a result DMI fungicides showed EC₅₀ from 0.014 to 63.09 mg.L⁻¹, SBI fungicide showed EC₅₀ from 0.07 to 0.81 mg.L⁻¹, SDHI and multisite fungicides showed EC₅₀ 43.12 to >100 mg.L⁻¹, QoI and MBC fungicides showed EC₅₀ >100 mg.L⁻¹. The isolates of *C. cf. flagellaris* were sensitive to the fungicides DMI and SBI, moderately sensitive to insensitive to the fungicides SDHI and multisite, and insensitive to the fungicides QoI and MBC. Chapter IV evaluated the reaction of 30 soybean cultivars to *C. cf. flagellaris*, inoculated by spraying the suspension of conidia and mycelium of the fungus. Thus, the highest severity of CLB was in the cultivars TMG7262 (2.67%), BRS6203 (2.63%) and BRS5601 (1.75%) for the isolate UPF C01, while for the isolate UPF C12, the cultivar with the highest severity was PIONEER 95R51 (1.83%).

Keywords: 1. Purple seed stain. 2. Cercospora leaf blight. 3. Pathogenicity. 4. Effective concentration 50%. 5. *Glycine max L.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	<i>Mancha púrpura da semente e crestamento foliar de Cercospora</i>	18
2.2	<i>Etiologia</i>	19
2.3	<i>Sintomas da mancha púrpura da semente (MPS) e do crestamento foliar de Cercospora (CFC)</i>	21
2.4	<i>Ciclo da doença</i>	23
2.5	<i>Condições ambientais para o desenvolvimento do complexo de doenças</i>	25
2.6	<i>Manejo do complexo de doenças</i>	26
2.6.1	Controle cultural	26
2.6.2	Controle genético	27
2.6.3	Controle químico	29
2.6.4	Tratamento de sementes	29
2.6.5	Aplicação foliar de fungicidas	31
2.6.6	Concentração efetiva 50% (CE ₅₀)	34
3	CAPÍTULO I	37
3.1	<i>Resumo</i>	37
3.2	<i>Introdução</i>	38
3.3	<i>Material e métodos</i>	40
3.3.1	Obtenção dos isolados de <i>Cercospora</i> spp.	40
3.3.2	Identificação molecular dos isolados de <i>Cercospora</i> spp.	43
3.3.3	Multiplicação dos isolados de <i>Cercospora</i> spp. e preparo do inóculo para a inoculação em plantas de soja	44
3.3.4	Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Cercospora</i> spp. em plantas de soja	44
3.3.5	Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Cercospora</i> spp. em sementes de soja	46
3.3.6	Extração e quantificação da cercosporina de isolados de <i>Cercospora</i> spp.	47
3.4	<i>Resultados e discussão</i>	48
3.4.1	Identificação molecular dos isolados de <i>Cercospora</i> spp.	48
3.4.2	Patogenicidade de isolados de <i>Cercospora</i> spp. em plantas de soja	50
3.4.3	Patogenicidade de isolados de <i>Cercospora</i> spp. em sementes de soja	54
3.4.4	Extração e quantificação de cercosporina de isolados de <i>Cercospora</i> spp.	58

3.5	<i>Conclusões</i>	59
4	CAPÍTULO II	60
4.1	<i>Resumo</i>	60
4.2	<i>Introdução</i>	61
4.3	<i>Material e métodos</i>	62
4.4	<i>Resultados e discussão</i>	65
4.5	<i>Conclusões</i>	72
5	CAPÍTULO III	73
5.1	<i>Resumo</i>	73
5.2	<i>Introdução</i>	74
5.3	<i>Material e métodos</i>	76
5.3.1	Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) de fungicidas para isolados de <i>Cercospora cf. flagellaris</i>	76
5.4	<i>Resultados e discussão</i>	79
5.5	<i>Conclusões</i>	88
6	CAPÍTULO IV	90
6.1	<i>Resumo</i>	90
6.2	<i>Introdução</i>	91
6.3	<i>Material e métodos</i>	92
6.3.1	Multiplificação dos isolados e preparo do inóculo para inoculação	93
6.3.2	Inoculação de <i>Cercospora cf. flagellaris</i> em cultivares de soja	93
6.4	<i>Resultados e discussão</i>	96
6.5	<i>Conclusões</i>	101
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
8	CONCLUSÃO GERAL	104
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXOS	116
	<i>Anexo I – Escala diagramática de James (1971).</i>	117

1 INTRODUÇÃO

A mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC), tem como agente causal um fungo do gênero *Cercospora*, sendo a espécie mais comumente associada a *C. kikuchii* (Matsu & Tomoyasu) Gardner. Recentemente, estudos demonstram que as espécies *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. nicotianae*, são as mais frequentes e estão associadas a MPS e ao CFC (ALBU et al., 2016; SAUTUA et al., 2019; SOARES et al., 2015). Essas doenças causadas por estas espécies de *Cercospora* estão amplamente disseminadas nas regiões produtoras de soja no mundo, ocorrendo em alta intensidade em anos que as condições ambientais são favoráveis, deste modo, possuem grande importância para a cultura da soja pois, são doenças responsáveis por redução do rendimento e perda da qualidade de grãos/sementes na cultura. No Brasil, encontram-se principalmente em regiões quentes e úmidas como no Cerrado, sendo a mancha púrpura a mais frequente em lotes de sementes.

Devido ao monocultivo da soja e ao sistema de plantio direto, as condições fornecem um ambiente favorável e propício para a sobrevivência e estabelecimento desses fitopatógenos nas áreas de cultivo, principalmente por se tratarem de serem fungos necrotróficos com fase saprofítica, estando presentes nos restos culturais, na matéria orgânica do solo e nas sementes. Presente nas sementes, o fungo apresenta infecção latente, principal característica das doenças de final de ciclo (DFC's), onde os sintomas geralmente se evidenciam no estágio reprodutivo da soja em R5 e R6 (início do enchimento de grãos ou sementes; grão verde ou vagem cheia, segundo escala de Fehr & Caviness, 1977), causando manchas e lesões em todas as partes da planta, com a evolução da doença, observa-se nas folhas o crestamento e desfolha prematura e, nas sementes, observa-se a coloração púrpura do tegumento das sementes, sendo esses os sintomas típicos do crestamento foliar de *Cercospora* e da mancha púrpura da semente (HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011; KIMATI et al., 2005; KLINGELFUSS; YORINORI, 2001).

A aptidão de *Cercospora* spp. causar danos no hospedeiro, está relacionada com a produção de uma toxina produzida pelo próprio fungo, chamada de cercosporina, a qual é responsável pela agressividade e evolução dos sintomas da doença, devido a cercosporina ser um composto fotoativo, que ao ser estimulada pela luz, induz a produção de espécies reativas de oxigênios (ERO's), que oxidam os lipídios presentes na membrana celular, que por consequência causam a ruptura e morte das células das plantas. A produção da cercosporina pelas espécies de *Cercospora* está diretamente relacionada com a patogenicidade do fungo pois, contribui para a infecção e retirada de nutrientes requeridos pelo fitopatógeno para seu desenvolvimento e multiplicação no hospedeiro (DAUB; EHRENSHAFT, 2000; SANTOS, 2015; UPCHURCH et al., 1991).

As estratégias de manejo da MPS e do CFC incluem o controle cultural e químico, sendo que o último tem sido o mais eficiente para o controle dessas doenças. O controle genético é outra técnica de manejo para muitas doenças na cultura da soja, porém, até o momento não se tem genes de resistência conhecidos e cultivares resistentes para a MPS e o CFC (KIMATI et al., 2005; GODOY et al., 2005). Há apenas uma breve percepção de cultivares que se demonstraram tolerantes ou suscetíveis quando essas doenças estavam presentes na safra da soja. Diante disso, a aplicação de fungicidas, torna-se fundamental para o controle dessas doenças.

Para o controle do CFC os fungicidas disponíveis, geralmente são dos grupos químicos Triazol (inibidores da desmetilação, IDM), Estrobirulina (inibidores da Quinona externa, IQe), Benzimidazol (Metil-benzimidazol-carbamato, MBC), Ditiocarbamato e Isoftalonitrila, sendo estes os multissítios (FRAC, 2020; KIMATI et al., 2005).

Entretanto, em decorrência da descoberta da associação de outras espécies de *Cercospora* causando a MPS e o CFC na soja, atrelada à falta de cultivares resistentes à essas doenças e, à poucos registros sobre a eficiência de fungicidas para o controle desses fitopatógenos e, ao contínuo uso de fungicidas para o controle das DFC's, o fungo pode vir a ter sua sensibilidade reduzida com o tempo, tornando necessário monitorar a eficiência dos fungicidas.

Quando estudos são desenvolvidos *in vitro* com espécies de *Cercospora*, de maneira geral, quando o fungo é isolado de partes de plantas sintomáticas em laboratório e cultivados em meios sintéticos, apresentam crescimento micelial lento e escassa ou nenhuma esporulação, o que dificulta o desenvolvimento de trabalhos em laboratório pois, alguns meios de cultura não são capazes de favorecer a indução da esporulação e ainda, devido ao lento crescimento, os riscos por contaminantes são favoráveis, que acaba dificultando o isolamento, purificação e inoculações artificiais do fungo em plantas (BRUNELLI et al., 2006; LOMBARDI, 2002).

Diversos fatores podem influenciar o crescimento vegetativo e reprodutivo de espécies de fungos, sendo a temperatura e a luminosidade entre os mais importantes. Para *Cercospora* temperaturas entre 25 e 27°C são satisfatórias para o desenvolvimento do fungo e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro proporcionaram a esporulação, assim como, o meio de cultura e a composição deste, pode influenciar no crescimento micelial e induzir ou inibir a produção de esporos (SANTOS, 2015; SOARES, 2003).

Deste modo, tendo em vista da importância da MPS e do CFC na cultura da soja e, assim como a carência de informações atuais sobre as doenças e sobre o fitopatógeno, os objetivos desse estudo foram:

- a) identificar as espécies dos isolados de *Cercospora* spp.;
- b) verificar a patogenicidade e quantificar a concentração de cercosporina destes isolados;
- c) avaliar o efeito de diferentes meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de *Cercospora* cf. *flagellaris*;
- d) determinar a concentração efetiva para inibir 50% da população em estudo (CE₅₀) aos fungicidas de diferentes grupos químicos (triazóis - IDM, morfolina - SBI II,

estrobirulinas - IQe, carboxamidas - ISDH, benzimidazol - MBC e mulissítios) e a sensibilidade para isolados de *Cercospora cf. flagellaris*;

e) avaliar a reação de cultivares de soja à *Cercospora cf. flagellaris*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O potencial produtivo da cultura da soja pode ser comprometido devido às condições climáticas, fatores abióticos, como a seca e, as condições física e química do solo, que podem limitar o desenvolvimento da cultura na área de cultivo e, por consequência favorecer o aparecimento de doenças provocadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, sendo estes fatores bióticos que também comprometem o potencial produtivo da cultura. Nas áreas de cultivo da soja é possível ter a presença de diversas espécies fitopatogênicas, as quais o surgimento varia conforme o ciclo infeccioso e as condições requeridas para o aparecimento da doença, assim como, a suscetibilidade do hospedeiro ou a presença de hospedeiros alternativos, ao fitopatógeno de alta capacidade reprodutiva, a eficiência na disseminação e agressividade e, as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do fitopatógeno (HARTMAN, WEST e HERMAN, 2011).

Com a expansão das áreas de sistema de plantio direto e o monocultivo da soja, doenças de final de ciclo (DFC'S), causadas por fungos necrotróficos com fase saprofítica, tem se tornado cada vez mais presentes nas regiões produtoras de soja, afetando o rendimento da cultura. As DFC'S são um grupo de doenças em que os sintomas se evidenciam principalmente no estágio reprodutivo da soja, mas dependendo da pressão de inóculo do fitopatógeno e as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento das DFC'S pode ocorrer desde os estádios iniciais da cultura. Estas doenças promovem desfolha e senescência precoce da planta, afetando a atividade fotossintética, qualidade e peso de grãos. Uma particularidade das DFC'S é que apresentam um período de incubação e latência, ou seja, da infecção até o surgimento dos sintomas e sinais do fitopatógeno se passam vários dias, o que complica a tomada de decisão para o controle químico (CARMONA e REIS, 2009).

As DFC's incluem os fitopatógenos *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore (antracnose), *Septoria glycines* Hemmi (mancha parda), *Cercospora kikuchii* (Mats. & Tomoy) Gardenar (mancha púrpura da semente e crestamento foliar de Cercospora) e espécies de *Phomopsis* [*Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell.) Sacc. var. *sojae* (Lehman) Wehm. (teleomórfica) / *Phomopsis sojae* Lehman (anamórfica) e *Phomopsis longicolla* Hobbs (anamórfica)] (seca da haste e da vagem e deterioração da semente), que causam perdas significativas na produção da cultura da soja (HOFFMANN et al., 2004; KLINGELFUSS e YORINORI, 2001).

A incidência dessas doenças pode ocorrer durante a fase inicial da cultura da soja, no entanto, os sintomas são geralmente observados a partir dos estádios reprodutivos da soja, sendo que a maior severidade dos sintomas é observada a partir do estágio R5 (início do enchimento de grãos, segundo a escala de Fehr & Caviness, 1977), que causam senescência e queda precoce das folhas, causando redução na qualidade e no rendimento de grãos (SAUTUA, 2021; KLINGELFUSS e YORINORI, 2001).

2.1 Mancha púrpura da semente e crestamento foliar de Cercospora

A mancha púrpura da semente teve o primeiro relato feito por Suzuki em 1921, na Coreia, e em 1924 foi observada novamente em Indiana por Gardner. Porém, apenas em 1925, Matsuda & Tomoyasu, isolaram sementes de soja com coloração púrpura e também observaram sintomas em folhas, hastes e vagens, descrevendo pela primeira vez o fungo da espécie *Cercospora kikuchii* como o agente causal de duas diferentes doenças, sendo a mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de Cercospora (CFC). Em 1951 Murakishi realizou o isolamento do fitopatógeno e experimentos com inoculações em plantas de soja foram conduzidos, que comprovou o postulado de Koch, Murakishi observou e descreveu sintomas nos caules e pecíolos como áreas ligeiramente aprofundadas, irregulares e de coloração roxa-avermelhada, também descreveu sintomas nas vagens como pequenas pontuações de coloração avermelhadas a avermelhadas-púrpura que com a evolução da doença tornaram-se de coloração púrpura (ALBU et al., 2016; PRICE, 2013).

O primeiro relato observado do CFC em áreas de cultivo de soja foi em 1980 por H. J. Walters, o qual forneceu uma ótima descrição dos sintomas foliares, onde as folhas superiores expostas apresentaram-se ligeiramente púrpura com lesões angulares e irregulares aparentes na parte adaxial e abaxial das folhas; as lesões podem coalescer formando áreas necróticas; em alta infecção da doença à ocorrência de clorose nas folhas que evolui para necrose, que resulta em desfolha que se inicia do ápice para a base da planta (ALBU et al., 2016; PRICE, 2013).

No Brasil, a MPS e o CFC são doenças de ampla ocorrência nas regiões produtoras de soja, porém com ocorrência mais severa em regiões quentes, úmidas e chuvosas como no Cerrado. A MPS e o CFC possuem grande relevância para o cultivo da soja, pois causam perdas significativas na produtividade e na qualidade dos grãos/sementes que chegam a 30% em condições favoráveis para a doença. O fitopatógeno possui a capacidade de acometer todas as partes da planta e pode ocorrer desde o início do estabelecimento da cultura. No entanto, os sintomas mais severos ocorrem a partir do início da antese até a maturidade fisiológica da soja. Os sintomas observados são manchas e crestamento em folhas e hastes. Nas sementes a coloração púrpura (roxa) do tegumento é o sintoma mais característico da doença. Tanto a MPS quanto o CFC podem ocorrer simultaneamente ou individualmente na cultura da soja, não estando correlacionadas entre si com a severidade dos sintomas (KLINGELFUSS e YORINORI, 2001; KUDO e BLUM, 2011; SOARES et al., 2015).

2.2 Etiologia

O gênero *Cercospora* é responsável pelo surgimento de doenças foliares em um amplo número de espécies hospedeiras, principalmente em culturas de grande importância econômica. O agente causal da MPS e do CFC é um fungo cosmopolita, necrotrófico com fase saprofítica denominado de *C. kikuchii* (Matsu & Tomoyasu) Gardner, que até então era conhecido como a única espécie causadora dessas doenças na cultura da soja. Em estudos recentes da filogenia molecular de isolados de *Cercospora* spp. provindos dos Estados Unidos, Argentina, Bolívia e Brasil, demonstraram que outras

espécies estão associadas aos sintomas de MPS e CFC na cultura da soja, sendo as espécies mais incidentes nas áreas de plantio a *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. nicotianae*. (ALBU et al., 2016; SAUTUA et al., 2019; SOARES et al., 2015). Até o momento são poucas as informações sobre essas espécies, apenas que antes eram espécies generalistas e foram identificadas em plantas de soja causando os sintomas característico da MPS e do CFC, sabe-se que *C. cf. flagellaris* é a espécie predominante com maior ocorrência nas áreas de plantio dos EUA (ALBU et al., 2016; ZIVANOVIC, et al, 2021).

O fungo fitopatogênico causador da MPS e do CFC em sua fase anamorfa/assexuada, pertence ao Filo Deuteromycota, Classe Hyphomycetes, Ordem Moniliales e a Família Dematiaceae. São chamados de fungos imperfeitos, por não apresentarem uma fase sexuada (teleomórfica) conhecida, tendo apenas a fase anamórfica. No entanto, alguns autores sugerem que a fase teleomórfica pode estar relacionada ao gênero *Mycosphaerella* (Capnodiales, Mycosphaerellaceae) (ANDRADE, 2016; GOODWIN, DUNKLE e ZISMANN, 2001; WEBSTER e WEBER, 2007).

Os sinais do fungo são as estruturas morfológicas da espécie na fase anamórfica, sendo os conídios e conidióforos. Os conídios são longos, retos ou curvos, hialinos, aciculares e septados (2 a 49 septos), medindo 50 – 375 μm x 2,5 – 5 μm , aos quais apresentam-se aderidos aos conidióforos, medindo 45 – 220 μm x 4 – 6 μm , sendo este uma hifa fértil que formam os conídios, apresentam coloração marrom-escura (ANDRADE, 2016; GOULARTE, 2018; PRICE, 2013). A disseminação dos conídios pode ser realizada pelo vento, respingos de água e sementes contaminadas (AMORIM e PASCHOALI, 2011; GOODWIN, DUNKLE e ZISMANN, 2001; GOULART, 2018; KIMATI et al., 2005).

A espécie *C. kikuchii* é conhecida por ser fitopatógeno específico da soja, sendo seu único hospedeiro. Contudo, espécies de *Cercospora* que causam a MPS e o CFC foram encontradas parasitando diversas espécies de plantas daninhas presentes nas áreas de plantio da soja, como *Amaranthus* sp. L. (caruru), *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (mastruz), *Siegesbeckia pubescens* L. (botão de ouro), *Siegesbeckia glabrescens* Makino e *Galinsoga parviflora* Cav. (picão branco), assim

como algumas espécies de plantas ornamentais, como *Begonia* sp. L., *Celosia argentea* var. *cristata* L. (crista-de-galo), *Hydrangea serrata* L. (hortências da montanha) e, *Tagetes* sp. L. (cravo-de-defunto), indicando falta de especificidade do fitopatógeno ao hospedeiro (BORGES, 2016; GROENEWALD et al., 2013).

2.3 Sintomas da mancha púrpura da semente (MPS) e do crestamento foliar de *Cercospora* (CFC)

Os sintomas podem ser observados em todas as partes da planta. Quando ocorrem nas sementes, observa-se a coloração púrpura do tegumento, devido a presença dos conídios e a produção de cercosporina, toxina produzida pelo fungo que está relacionada a agressividade do fitopatógeno com a progressão da doença. O complexo de doenças causado por *Cercospora*, possui infecção latente, tendo poucos relatos da ocorrência de sintomas na fase inicial da cultura da soja. Os sintomas mais severos podem ser observados nos estádios fenológicos avançados (reprodutivos) da cultura (COSTA, 2005; KLINGELFUSS e YORINORI, 2001).

Os sintomas geralmente são observados no final de ciclo da soja, nos estádios reprodutivos, sendo a partir do estágio R5 (início do enchimento de grãos), R6 (estádio de grão verde ou vagem cheia) e R7 (início da maturação das sementes), de acordo com a escala de Fehr & Caviness, 1977, observando-se o desenvolvimento de sintomas nas hastes, vagens e nas folhas (Figura 1). Nas hastes observam-se manchas vermelhas irregulares, podendo evoluir para necrose na medula. Nas vagens ocorrem manchas punctiformes, de coloração vermelha e a evolução da doença apresenta coloração castanho-avermelhada e atravessam todo o tecido da vagem chegando até as sementes. Nas sementes observa-se o tegumento com uma coloração púrpura (roxa), sendo esse o sintoma característico da MPS. As folhas apresentam pontuações escuras, castanho-avermelhadas de formato irregular, iniciando-se pelas margens e progredindo para o centro da folha, que coalescem com a evolução da doença para manchas escuras, apresentando como característica o crestamento e desfolha prematura (KIMATI et al., 2005; KLINGELFUSS e YORINORI, 2001; KUDO, BLUM e LIMA, 2011; SAUTUA, 2021).

Figura 1 - Sintomas de mancha púrpura da semente (MPS) (A) e do crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) em folhas (C), vagens (B e D) e hastes (D) em soja. FMAV/UPF. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: A - Silva, M. A., 2020; B, C e D - Rosa, D., 2019.

A capacidade de *Cercospora* causar danos no seu hospedeiro, está correlacionada com a produção de cercosporina, um metabólito secundário produzido pelo próprio fungo, de coloração avermelhada ou arroxeada. Essa substância é responsável pela

evolução e agressividade da doença pois, é altamente tóxica aos tecidos das plantas, principalmente por ser um composto que é ativado pela luz, demonstrando que a luminosidade pode ser um dos fatores responsáveis pelo aparecimento dos sintomas do complexo das doenças. A cercosporina ao ser estimulada pela luz induz a produção de oxigênio simples (O_2), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), espécies reativas de oxigênio (ERO'S), que possuem a capacidade de peroxidar lipídios, levando a ruptura da membrana celular das plantas, que por consequência, ocorre o extravasamento do conteúdo celular, causando a morte celular. A produção de cercosporina pelas espécies de *Cercospora* spp. contribui para a infecção do fitopatógeno e na retirada dos nutrientes requeridos pelo fungo para seu desenvolvimento e multiplicação no hospedeiro (DAUB e EHRENSHAFT, 2000; SANTOS, 2015; UPCHURCH et al., 1991). Segundo Almeida et al. (2005) a agressividade do fitopatógeno e a severidade dos sintomas em folhas de soja está diretamente relacionada com a produção de cercosporina, assim como o tamanho das lesões.

2.4 Ciclo da doença

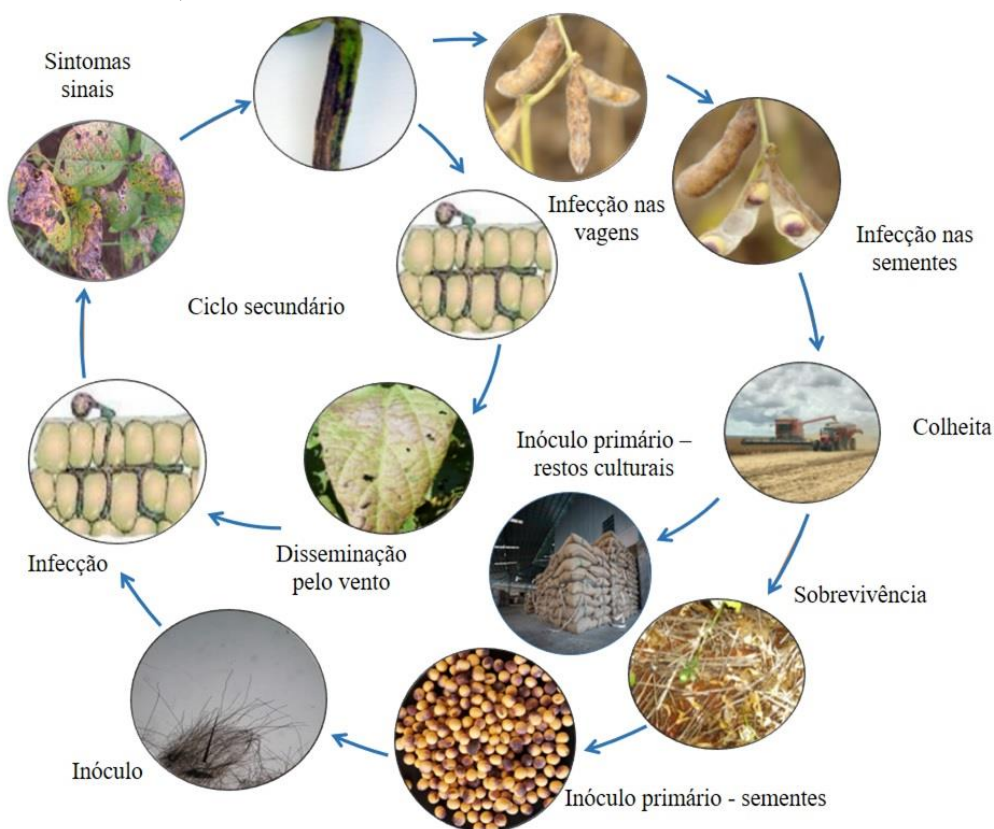
O desenvolvimento da MPS e do CFC pode ser representado pela ocorrência de vários eventos ordenados e sucessivos que se repetem, esse conjunto de eventos estabelece o ciclo das relações patógeno-hospedeiro. O fungo é um fitopatógeno necrotrófico que possui uma fase saprófita (Figura 2), sobrevivendo sobre os restos culturais, matéria orgânica do solo e em sementes, sendo a semente e os restos culturais as principais fontes de inóculo primário. Os conídios produzidos pelo fungo se caracterizam por esporos secos, desse modo, a remoção, liberação e disseminação dos conídios ocorre pela ação do vento, sendo transportados para áreas próximas de plantio (AMORIM e PASCHOALI, 2011).

A capacidade de sobrevivência de *Cercospora* está na produção de clamidósporos, estruturas de resistência, que possibilitam a sobrevivência do fitopatógeno nos restos culturais por longos períodos na ausência do hospedeiro, outro mecanismo de sobrevivência é o microciclo de conidiação, processo em que o ciclo de vida torna-se mais

curto onde os conídios germinam e logo ocorre a formação de outros conídios, sem que ocorra intervenção do crescimento micelial. O fungo pode permanecer viável nos restos culturais de soja por até 42 meses, o que contribui para o inóculo na próxima safra (PRICE, 2013). Além disso, a semente é outro meio de sobrevivência do fitopatógeno pois, a capacidade do fitopatógeno em infectar as sementes, favorece sua dispersão nas áreas de cultivo, ampliando as áreas de infecção por *Cercospora* (ALMEIDA et al., 2005; PRICE, 2013).

Os propágulos do fungo atingem a planta sadia e iniciam a infecção, que requer água livre na superfície do órgão, então se inicia pela pré-penetração e termina com o início das relações parasitárias entre o fitopatógeno e o hospedeiro, marcando o início da patogênese com a observação dos sintomas típicos da doença. A pré-penetração tem início com a germinação dos conídios, originando o tubo germinativo, que se movimenta em direção ao local de penetração, a qual pode ocorrer por aberturas naturais, por ferimentos ou pelo rompimento da epiderme (AMORIM et al., 2011). Em *C. kikuchii* a penetração das hifas ocorre de maneira direta, quando as hifas penetram diretamente na cutícula há a formação do apressório, quando a penetração ocorre pelos estômatos não há formação do apressório. Já na semente as hifas podem penetrar pelos poros ou rachaduras do tegumento e na região do hilo. No interior da semente ocorre a formação de agregados de hifas, o fungo pode infectar as células da hipoderme (células em ampulheta ou osteosclereídeos) e células do parênquima, sendo observada concentrações maiores de micélio na região do hilo da semente, eventualmente a *Cercospora* infecta os cotilédones (PRICE, 2013; SINGH e SINCLAIR, 1986).

Figura 2 - Ciclo do complexo de doenças mancha púrpura da semente e do crestamento foliar de *Cercospora*, causado por *Cercospora* spp. em soja. FAMV/UPF. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

2.5 Condições ambientais para o desenvolvimento do complexo de doenças

As condições que favorecem o desenvolvimento do complexo de doenças são temperaturas de 15 a 30 °C, sendo que a temperatura ótima é de 25 °C, alta umidade e molhamento foliar de pelo menos 18 horas, havendo maior intensidade dos sintomas na planta (GODOY et al., 2007; SCHUH, 1991). Segundo Kudo, Blum e Lima (2011), temperaturas entre 20 e 24 °C e umidade relativa acima de 80% intensificaram os sintomas do crestamento foliar em plantas de soja, assim como uma maior liberação de conídios, indicando que pode haver relação da severidade da doença com a quantidade de conídios liberado pelo fitopatógeno. Fatores abióticos como o vento e a água (precipitação pluviométrica, orvalho) auxiliam na disseminação dos esporos de *Cercospora*, assim

como alta densidade populacional de plantas favorecem o desenvolvimento do complexo de doenças.

2.6 Manejo do complexo de doenças

O manejo da MPS e do CFC pode ser realizado a partir do controle cultural e químico. Sabe-se que o controle genético é a forma mais econômica e indicada para o controle da maioria das doenças de soja, no entanto, segundo Almeida et al. (2005) para a MPS e o CFC não há conhecimento de cultivares resistentes, sabe-se apenas que algumas cultivares de soja são tolerantes à *Cercospora* spp. e, desse modo, o controle químico tem sido mais eficiente para o controle dessas doenças.

A estratégia do controle das doenças deve ser realizada através do manejo integrado, ou seja, utilizar todas as técnicas disponíveis, que garanta que a população do fitopatógeno permaneça abaixo do limiar de dano econômico, assim como reduzir danos ao meio ambiente. Para o manejo da MPS e do CFC os controles culturais e químicos auxiliam na redução e controle do complexo de doenças nas áreas de plantio de soja. (GODOY et al., 2014; KIMATI et al., 2005).

2.6.1 Controle cultural

O controle cultural da MPS e do CFC pode ser realizado a partir da rotação de culturas, espaçamento e população de plantas conforme as recomendações para a cultura, de adubação equilibrada e uso de sementes saudáveis. A rotação de culturas proporciona a quebra do ciclo do fitopatógeno, pois o fungo sobrevive saprofiticamente nos restos culturais e matéria orgânica do solo, deve-se utilizar plantas não hospedeiras, além disso, a rotação de culturas proporciona melhora nas condições físicas e químicas do solo, proporcionando uma melhor disponibilidade de nutrientes para as plantas. Para a espécie *Cercospora kikuchii*, a rotação com a cultura do milho no verão reduz o inóculo do fungo nas áreas de cultivo, além disso, o plantio de culturas de inverno como, o trigo e cevada, por exemplo, podem quebrar o ciclo do fitopatógeno, reduzindo o inóculo primário, nesse

caso os restos culturais de soja da safra anterior (COSTA, 2005; DEBIASI et al., 2015; HOFFMANN et al., 2004).

O uso de adubação equilibrada também é indicado para a redução da incidência das doenças, pois sabe-se que uma nutrição equilibrada promove plantas mais vigorosas, no caso da soja, a adubação pode ser realizada com ênfase no potássio, por ser o elemento mineral que mais ativa enzimas nos processos químicos na planta e por ser o responsável pela ativação do metabolismo secundário das plantas, que está diretamente associado com os mecanismos de defesas dos vegetais. Além disso, o uso de sementes certificadas e saudáveis pode evitar a disseminação das doenças nas áreas de plantio (AMTMANN et al., 2008; COSTA, 2005; HOFFMANN et al., 2004).

2.6.2 Controle genético

O melhoramento genético de plantas teve início desde os primórdios do surgimento da agricultura, sendo no início realizado pelas antigas populações de forma inconsciente e, na modernidade a resistência genética visa a obtenção de plantas resistentes às moléstias, sendo mais tolerantes a fatores abióticos e bióticos, com melhor adaptação ecológica, e ainda mais produtivas. Além disso, a resistência genética auxilia no manejo integrado de pragas e doenças, que colabora para a sustentabilidade ambiental, reduzindo o impacto ambiental, além de ser um método mais econômico para os produtores que utilizarão menos insumos no cultivo de culturas como soja, milho e trigo, etc (MATIELLO, BARBIERI e CARVALHO, 1997).

A grande contribuição do melhoramento genético de plantas à agricultura foi o desenvolvimento de cultivares resistentes as doenças, sendo que algumas doenças, como as viroses são apenas controladas através da resistência genética. Em relação aos fungos fitopatogênicos, estes apresentam grande variabilidade genética dentro das populações, podendo serem controlados devido a descoberta de fontes de genes de resistência. Para isso é necessário o entendimento da biologia e epidemiologia dos fitopatógenos pois, estes com o tempo podem vir a superar os genes de resistências (THUROW, CASTRO e PEREIRA, 2018).

O melhoramento visando a resistência genética as doenças levam em consideração se esta é qualitativa (vertical) ou quantitativa (horizontal). O caráter qualitativo está associado com a habilidade de genes maiores controlarem a infecção causada por raças específicas dos fitopatógenos, podendo ser controlado por um ou poucos genes (monogênico ou oligogênico) obtidos a partir de retrocruzamentos entre as plantas. Já o melhoramento de caráter quantitativo é controlado por vários genes (poligênico) de menor efeito na planta, proporcionando a resistência parcial ao fitopatógeno, reduzindo a severidade dos sintomas no progresso das doenças (MATIELLO, BARBIERI e CARVALHO, 1997; MACIEL e DANELLI, 2018; THUROW, CASTRO e PEREIRA, 2018).

Na cultura da soja, a resistência genética é bem empregada para a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e para as podridões radiculares e da haste (*Phytophthora sojae*). Para doenças causadas pelo gênero *Cercospora*, ainda são poucas as informações sobre cultivares resistentes, na cultura da beterraba foram descobertos dois genes dominantes (*Qcr1* e *Qcr4*) que conferem resistência ao fitopatógeno *C. beticola*, esses genes dominantes são receptores específicos reponsáveis por reconhecerem o sinal emitido pelo fitopatógenos, nesse caso uma molécula elicitora (MACIEL e DANELLI, 2018). Martins Filho, Gravina e Sedyama (2002) estudaram o controle genético da resistência a doença mancha-olho-de-rã, causada por *C. sojina* Hara, em linhagens de soja, e chegaram a conclusão de que a resistência é de caráter quantitativo, sendo a doença controlada por múltiplos genes.

Para a MPS e o CFC, ainda não foram identificados genes de resistência em plantas de soja no Brasil, sendo apenas observado diferentes níveis de suscetibilidade entre cultivares, permanecendo assim até o presente momento. A falta de identificação de genes de resistência para essas doenças pode estar ligada com a variabilidade da população do fitopatógeno, o que dificulta a seleção de genótipos resistentes e identificação de genes. Estudos realizados com genótipos e linhagens de soja nos Estado Unidos identificaram um gene dominante de resistência para a MPS, a partir do uso de um marcador genético (ALMEIDA et al., 2005; ALLOATTI et al., 2015).

2.6.3 Controle químico

O controle químico muitas vezes é o único capaz de controlar as doenças de plantas, sendo umas das práticas mais eficientes para garantir altas produtividades e qualidade da produção. O maior uso de produtos químicos se intensifica nos países economicamente desenvolvidos, devido a disponibilidade de tecnologias avançadas, como aplicação em maior escala de insumos e previsão de melhores resultados nas colheitas (DEUNER, NICOLINI e CARLINI, 2009).

O uso dos defensivos químicos pode ser utilizado para o tratamento de sementes e para a aplicação da parte aérea no controle de muitas doenças que acometem a cultura da soja, entre elas a MPS e o CFC. Desse modo, os fungicidas são substâncias químicas que possuem propriedades fungitóxicas, ou seja, são tóxicos aos fungos, que controlam as doenças a partir da inibição do crescimento micelial ou da esporulação dos fungos (REIS, REIS e CARMONA, 2019).

2.6.4 Tratamento de sementes

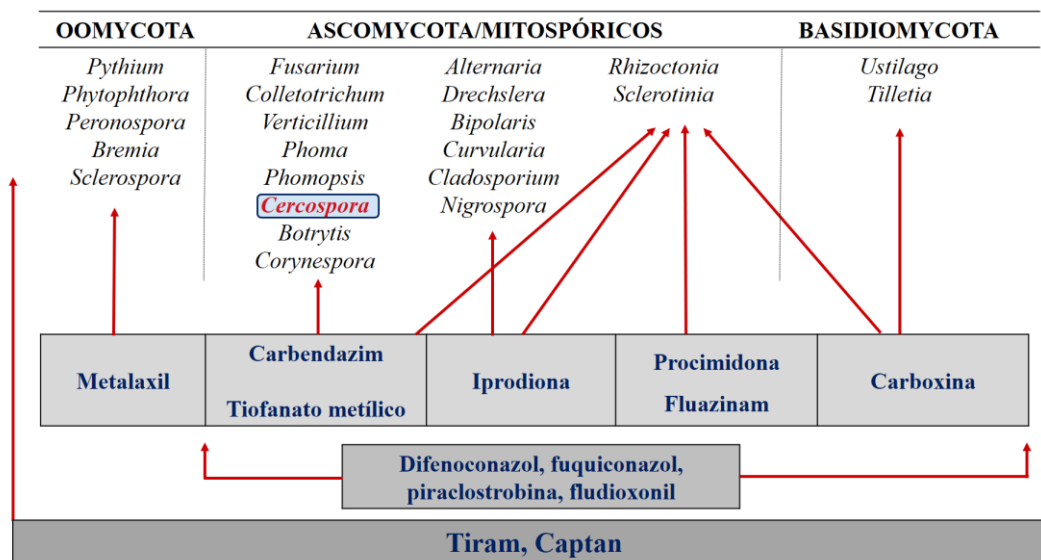
A realização do tratamento de sementes (TS) visa destruir ou inativar os fitopatógenos presentes nas sementes, protegendo-as do ataque de fungos patogênicos presentes no solo, de modo que a semente não seja fonte de inóculo. Além disso, impedem que o fungo se estabeleça e infecte as raízes e alcancem a superfície e colonizem a parte aérea das plantas (REIS, REIS e CARMONA, 2019).

O tratamento de sementes é um dos meios de controle dos fitopatógenos mais importantes, pois a semente colonizada pelo fungo é a principal fonte de inóculo primário em áreas de plantio, pelo fato de servirem como mecanismo de sobrevivência e disseminação dos fitopatógenos, estando diretamente relacionada ao desenvolvimento inicial de muitas espécies de fitopatógenos que acometem os órgãos aéreos das principais espécies cultivadas pelo homem. Para a cultura da soja, além de reduzir o risco de introdução e disseminação dos fitopatógenos, também visa assegurar a germinação em

solos em condições inadequadas de baixas temperaturas e umidade e, viabilizar o uso de sementes com poder germinativo menor que 80% (REIS, REIS e CARMONA, 2019).

A utilização do tratamento de sementes com fungicidas para o manejo das doenças promove uniformidade e melhora o estabelecimento das plantas, pois mantém o desempenho fisiológico das sementes, além do efeito residual do produto que proporciona proteção durante as fases iniciais da cultura. Os fungicidas disponíveis para o TS são os de amplo espectro e específicos (Figura 3). Fungicidas de amplo espectro controlam um número maior de fitopatógenos, como o captan, tiram e o gupo do benzimidazol, que são o carbendazim e o tiofanato metílico. Os fungicidas específicos possuem atuação em um ou dois grupos de fitopatógenos, sendo o metalaxyl, carboxina e iprodiona. Para o controle da MPS pode-se utilizar fungicidas de média desempenho e de amplo espectro, assim como os fungicidas específicos que possuem atuação em um ou dois grupos de fitopatógenos, o carbendazim e o tiofanato metílico. Os fungicidas disponíveis para o TS e que se demonstraram eficientes para o controle das doenças são o carbendazim, carboxina + tiram, tiram e tiofanato metílico (GUTERRES et al., 2017).

Figura 3 - Fungicidas disponíveis para o tratamento de sementes relacionados com o fitopatógeno. FAMV/UPF. Passo Fundo, Rio Grande Do Sul, 2022.



Fonte: Deuner, C. C. modificado, 2016.

2.6.5 Aplicação foliar de fungicidas

O tratamento dos órgãos aéreos baseia-se na pulverização recorrente de fungicidas protetores, curativos e erradicativos em folhas, ramos e frutos para prevenir a infecção do hospedeiro ou interromper a colonização do fitopatógeno, caso já tenha se estabelecido no hospedeiro, além disso, a aplicação foliar visa reduzir ou eliminar a fonte de inóculo (KLINGELFUSS e YORINORI, 2001; REIS, REIS e CARMONA, 2019).

O uso dos fungicidas na cultura da soja foi recomendado pela primeira vez para o controle de oídio (*Erysiphe diffusa*), após um surto epidêmico em 1996/97 e, posteriormente, das doenças de final de ciclo (DFC's) *Septoria glycines* e *C. kikuchii*, em função do monocultivo da soja e da ausência de rotação de culturas. Após o aparecimento da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) em 2001 e ausência de cultivares resistente para essa doença, houve o registro de novos produtos e novamente uma intensificação do uso dos fungicidas e, na safra 2013/14 sendo realizada em média três aplicações de fungicidas em mais de 90% das áreas de plantio no Brasil (GODOY, 2015; GODOY et al., 2007).

A partir do uso dos fungicidas para o controle do oídio e da ferrugem asiática da soja, produtores e técnicos começaram a observar que muitos dos produtos também controlavam as manchas foliares, denominadas de DFC's. O critério do uso dos fungicidas em soja por muitos anos foram se ajustando conforme as necessidades e melhor resposta do controle das doenças em soja, que geralmente, eram aplicados entre florescimento, formação de vagens e início e meio da granação (DEUNER, NICOLINI e CARLINI, 2009). A partir disso, começou a ser observada as condições climáticas favoráveis para a ocorrência das doenças de soja, assim como o nível de infecção das doenças e o estágio fisiológico da cultura da soja para a definição do momento de aplicação dos fungicidas.

Para a *C. kikuchii* e espécies associadas que causam a MPS e o CFC, o momento da definição do controle químico via aplicação foliar dos fungicidas, irá depender das condições climáticas, pois o desenvolvimento da doença, depende da ocorrência de

chuvas frequentes e de temperaturas entre 22 e 30 °C durante o ciclo da cultura. Além disso, deve-se levar em consideração o estágio fenológico da cultura, para a soja indica-se a aplicação quando a planta se encontra em estágio R1 a R5.3, como forma preventiva, além de considerar os custos com a aplicação do controle químico e o espectro de ação do fungicidas (REIS, REIS e CARMONA, 2019).

Os fungicidas são classificados quanto ao mecanismo de ação e grupo químico. O mecanismo de ação dos fungicidas resultam na interferência dos processos metabólicos dos fungos, causando sua morte. Os fungicidas atuam principalmente na membrana plasmática, mitocôndria, retículo endoplasmático liso e rugoso, ribossomos e núcleo. Os grupos químicos disponíveis para o controle de *C. kikuchii* são carboxamida, estrobilurina, triazol, benzimidazol, cúprico, ditiocarbamato e isoftalonitrila, sendo os últimos dois os multissítios (FRAC, 2020; REIS, REIS e CARMONA, 2019; RODRIGUES, 2006).

O mecanismo de ação dos fungicidas dos grupos químicos da carboxamida e estrobilurina agem como inibidores da respiração, que ocorre nas cristas mitocondriais da mitocôndria, mas cada um age em um sítio diferente durante o processo de respiração. As carboxamidas são inibidores do complexo II da succinato-desidrogenase da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (ISDH). A succinato-desidrogenase é uma enzima responsável pelo transporte de elétrons. A carboxamida impede a oxidação da succinato a fumarato. Os principais fungicidas deste grupo são o benzovindiflupir, fluxaproxade e bifaxen. A estrobilurina é inibidora do complexo III da quinona externa (IQe) da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, as estrobilurinas inibem a quinona externa, bloqueando a passagem dos elétrons do citocromo b para o citocromo c1 no sítio da Qe, interferindo na produção do ATP. Os fungicidas mais comuns deste grupo são azoxistrobina, piraclostrobina, cresoxim-metílico, trifloxistrobina e picoxistrobina. De acordo com a FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), esses dois grupos químicos são classificados como fungicidas de médio a alto risco e de alto risco de resistência, pelo fato de atuarem em apenas um sítio específico no fungo (FRAC, 2020; REIS, REIS e CARMONA, 2019; RODRIGUES, 2006).

O triazol é inibidor da desmetilação (IDM), atuam sobre a integridade da membrana plasmática, promovendo a inibição da biossíntese de ergosterol, inibem a enzima C14-desmetilase da rota bioquímica da síntese do ergosterol pelo precursor lanosterol, impedindo a formação da membrana plasmática. Os fungicidas mais comuns são ciproconazol, difenoconazol, epoxiconazol, protioconazol, flutriafol, metconazol, propiconazol, tebuconazol e tetraconazol, estes são classificados como médio risco para desenvolvimento da resistência (FRAC, 2020; REIS, REIS e CARMONA, 2019; RODRIGUES, 2006).

Os fungicidas do grupo químico morfolina, segundo a classificação do FRAC (2020) são fungicidas inibidores da biossíntese de esteróis, classe II (SBI: Classe II). Agem em diversos sítios na biossíntese do ergosterol, onde o principal sítio de inibição é das enzimas $\Delta^{8,7}$ isomerase e Δ_{14} redutase, sendo este fator que difere a morfolina do triazol. Além disso, a morfolina possui outros mecanismos de ação, interferindo nas vias metabólicas da biossíntese protéica, lipídica e dos carboidratos. O grupo morfolina atua após a germinação dos esporos, no processo de desenvolvimento do tubo germinativo e na formação do haustório dos fungos (RODRIGUES, 2006). Os principais fungicidas desse grupo são aldimorfe, dodemorfe, tridemorfe, piperidina e fenpropimprfe, sendo este último o mais comumente utilizado na cultura da soja (FRAC, 2020; RODRIGUES, 2006).

O grupo químico do benzimidazol (Metil Benzimidazol Carbamato – MBC) age sobre a divisão celular na mitose, durante a divisão da metáfase, o qual inibe a síntese da tubulina, envolvida na formação do fuso e na separação dos cromossomos durante a divisão celular e, por consequência não há separação dos cromossomos, que resulta na morte celular. Fazem parte desse grupo químico os fungicidas carbendazim, tiabendazol e tiofanato metílico. São fungicidas classificados como sendo de alto risco para desenvolvimento da resistência (FRAC, 2020; REIS, REIS e CARMONA, 2019; RODRIGUES, 2006).

Os multissítios interferem em diversos processos da célula dos fungos e desse modo, possuem um amplo espectro no controle das doenças. Fazem parte dos multissítios

o grupo químico ditiocarbamato, sendo o principal fungicida desse grupo o mancozebe, e o grupo químico isoftalonitrila, fazendo parte desse grupo o fungicida clorotalonil. Esses fungicidas afetam a respiração celular, a permeabilidade das membranas e, principalmente agindo simultaneamente na atuação de diversas enzimas responsáveis pelos processos metabólicos vitais para os fungos, além disso possuem a capacidade de formar compostos com metais pesados. Os multissítios possuem baixo risco de resistência, pelo fato de agirem sobre diferentes organelas da célula do fungo (BALARDIN et al., 2017; FRAC, 2020; REIS, REIS e CARMONA, 2019; RODRIGUES, 2006).

2.6.6 Concentração efetiva 50% (CE₅₀)

O uso de fungicidas é uma das principais técnicas de manejo para o controle das doenças de plantas cultivadas, no entanto, o uso contínuo pode ocasionar a seleção de fitopatógenos resistentes e a perda de sensibilidade dos fungos e, com isso reduzir a eficiência dos fungicidas (GHINI e KIMATI, 2002).

A fungitoxicidade consiste na propriedade específica de alguma substância ou molécula química se demonstrar ser tóxica aos fungos em baixas concentrações, enquanto a sensibilidade demonstra a reação do fungo ao fungicida (GHINI e KIMATI, 2002; REIS, REIS e CARMONA, 2019). Para verificar a fungitoxicidade dos fungicidas e a sensibilidade dos fungos a uma substância tóxica é determinada a dose efetiva (DE), ou concentração efetiva (CE₅₀) ou a concentração inibitória (CI₅₀), para cada parâmetro é atribuído o valor 50 que corresponde a concentração de um produto químico capaz de inibir 50% do crescimento micelial e de esporos viáveis de uma espécie de fungo. Desse modo, uma substância é considerada como fungicida quando atua em baixas concentrações (MINHO et al., 2016; REIS, REIS e CARMONA, 2019;).

Edgington et al. (1971) em seu estudo propôs que uma substância é considerada fungitóxica quando esta apresentar valor inferior a 50 mg.L⁻¹ (= 50 ppm), o que significa que a substância foi capaz de controlar em 50% a população de um determinado fitopatógeno. Classificou em quatro categorias de dose efetiva (DE₅₀), sendo que DE₅₀

menor que 1 mg.L^{-1} (=1 ppm) as substâncias químicas são altamente fungitóxicas, DE_{50} entre 1 e 50 mg.L^{-1} são consideradas moderadamente fungitóxicas e quando a DE_{50} for maior que 50 mg.L^{-1} a substância química não é tóxica, ou seja, é atóxica a determinado fitopatógeno.

Quanto a sensibilidade do fitopatógeno aos fungicidas, os fungos são altamente sensíveis aos fungicidas quando o valor da CE_{50} for menor que 1 mg. L^{-1} ; moderadamente sensíveis aos fungicidas quando o valor da CE_{50} está entre 1 e 10 mg. L^{-1} ; e os fungos são considerados insensíveis aos fungicidas quando o valor da CE_{50} é igual ou superior a 50 mg. L^{-1} (EDGINTON et al., 1971).

A concentração efetiva 50% (CE_{50}) pode modificar-se com o tempo, isso quer dizer que, a sensibilidade dos fungos aos fungicidas pode ser alterada com o tempo, devido ao uso contínuo e repetitivo de um mesmo fungicida visando o controle de um determinado fitopatógeno. Os mecanismos de variabilidade genética e a agressividade da população dos fitopatógenos podem levar a insensibilidade dos fungicidas (REIS, REIS e CARMONA, 2019).

As espécies dos fungos *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. (Mathre, 1982), causador da mancha-em-rede, e *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. In. Marchal, causador do oídio, ambos fitopatógenos da cultura da cevada, apresentaram alteração da sensibilidade ao fungicida triadimenol, utilizado no tratamento de sementes. Também foi relatada a redução da sensibilidade de fitopatógenos da cultura do trigo, sendo os fungos *Puccinia triticina* Erikss (ferrugem-da-folha-do-trigo) e *Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici* (Em. Marchal) (oídio) aos fungicidas IDM (triazóis). E mais recentemente, perda da sensibilidade aos fungos presentes na cultura da soja, a espécie *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, causadora da ferrugem-asiática, que demonstrou resistência aos triazóis (IDM), estrobilurinas (IQe) e as carboxamidas (ISDH) e, a espécie *Corynespora cassicola* Berk. & M. A. Curtis C. T. Wei, causador da mancha-alvo que demonstrou perda de sensibilidade ao carbendazim (MBC) (REIS, REIS e CARMONA, 2019; REIS et al., 2013).

Diante da ocorrência da redução da sensibilidade dos fungos aos fungicidas, deve-se realizar o monitoramento da sensibilidade do fungo. Esse monitoramento pode ser feito através da determinação da concentração efetiva 50% (CE_{50}), sendo esta, uma ferramenta essencial para os programas de controle químico das doenças de plantas, sendo somente a partir da CE_{50} que se pode quantificar a redução da sensibilidade no futuro. O estudo da CE_{50} é importante em dois momentos, quando o fungo ainda é sensível e a futura, quando a sensibilidade é alterada para maior, indicando a redução da sensibilidade aos fungicidas (REIS, REIS e CARMONA, 2019).

Quando há suspeita de ocorrência na falha do controle no campo, o método científico da CE_{50} serve como um parâmetro de avaliação da perda de eficácia dos fungicidas, que comprova a redução de sensibilidade de fungos. O monitoramento da resistência tende a prever seu aparecimento, apurar suspeitas de sua ocorrência prática, avaliar estratégias que possam evitá-las, acompanhar seu comportamento ao longo do tempo, orientar a seleção e o uso de fungicidas e avançar o conhecimento sobre o tema. Assim, o monitoramento da sensibilidade dos fungos torna-se essencial para os programas de controle, tendo em vista que a mensuração da resistência pode ser realizada independentemente dos mecanismos de ação dos defensivos químicos (FRAC, 2020; REIS, REIS e CARMONA, 2019).

Segundo Gulart (2009) o conhecimento detalhado do modo de ação dos fungicidas assim como o correto monitoramento das populações de fitopatógenos analisados de modo integrado, especialmente na identificação da variabilidade da população de fitopatógenos incidentes nas áreas de cultivo, é de fundamental importância para manter a longevidade da eficácia dos fungicidas para os controles das doenças.

O monitoramento a partir da CE_{50} , torna-se relevante para os fabricantes de produtos químicos que desejam desenvolver um produto novo, pois o conhecimento dos riscos de ocorrência de resistência auxiliará a determinar se o produto deve ser desenvolvido e introduzido no mercado, e se for o caso, quais estratégias de manejo para o controle dos fitopatógenos, e por quanto tempo deve ser realizado o monitoramento para evitar que ocorra a perda de eficácias dos produtos (BRENT, 1999).

3 CAPÍTULO I

Identificação morfológica e molecular, patogenicidade e produção de cercosporina de isolados de *Cercospora* spp. de soja do Brasil

3.1 Resumo

O fungo *Cercospora kikuchii* por muitos anos foi mencionado como fitopatógeno específico da soja, causando as doenças mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC). No entanto, pesquisas recentes demonstraram que outras espécies do gênero *Cercospora* podem estar associadas à MPS e ao CFC, sendo as mais frequentes *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. cf. nicotianaea*. Adicionalmente, os sintomas, a patogênese e a agressividade das espécies de *Cercospora* estão diretamente relacionadas com a produção da toxina cercosporina. A identificação do fungo pode ser realizada pela morfologia, porém a distinção das espécies é difícil, desse modo, a análise molecular com *primers* específicos para diferenciação das espécies é mais confiável. Portanto, os objetivos deste estudo foram realizar a identificação morfológica e molecular de isolados de *Cercospora* spp., assim como, avaliar a patogenicidade em plantas e sementes de soja e, quantificar a concentração de cercosporina desses isolados. Vinte e nove isolados de *Cercospora* spp. foram submetidos à identificação morfológica das características das estruturas fúngicas e molecular da região interna do espaçador transcrito (ITS) para obtenção das espécies. Após, os isolados foram inoculados artificialmente em plantas de soja em estágio V4 por aspersão da suspensão de esporos e micélio do fungo. Constatados os sintomas característicos de crestamento foliar de *Cercospora* realizou-se o isolamento de folhas sintomáticas em meio de cultura BDA para comprovação do Postulado de Koch. Para comprovar a patogenicidade em sementes de soja, essas foram inoculadas por meio da técnica de restrição hídrica com manitol, sendo o meio de cultura colonizado pelo fungo e, após a incubação foram submetidas ao teste de sanidade e germinação. Dos 29 isolados identificaram-se 69% (20) *Cercospora cf. flagellaris* (69%), 14% (4) *C. canescens*, 7% (2) *C. dichondrae*, 4% (1) *C. helianthicola*, 3% (1) *C. beticola* e 3% (1) *C. lagenariae* (3%). Todos os isolados avaliados nesse estudo foram patogênicos à soja. Não houve diferença estatística para a germinação de sementes infectadas pelo fungo *C. cf. flagellaris*, apenas os isolados UPF C12 (57%) e UPF C13 (59%), apresentaram menor germinação. A concentração de cercosporina dos isolados foi de 0,001 a 0,008 nmol/mL. Por fim, nenhuma espécie de *C. kikuchii* foi identificada nesse estudo, a espécie mais frequente foi *C. cf. flagellaris*, seguida das espécies *C. canescens* e *C. dichondrae* e, respectivamente *C. helianthicola*, *C. beticola* e *C. lagenariae* com menor frequência. Por último, confirmaram-se os Postulados de Koch para os 29 isolados de *Cercospora* inoculados em sementes e plantas de soja, a concentração de cercosporina variou entre os isolados e a germinação de sementes infectadas não foi afetada nesse estudo.

Palavras-chave: 1. Mancha púrpura da semente. 2. Crestamento foliar de *Cercospora*. 3. Toxina. 4. Patogênese. 5. Postulado de Koch.

3.2 Introdução

A mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) são doenças de final de ciclo (DFC's) que tem comumente como agente causal o fungo *Cercospora kikuchii* (Mats. & Tomoy) Gardenar. Contudo, estudos recentes demonstraram a existência de outras espécies associadas com a MPS e o CFC, sendo a *Cercospora cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. cf. nicotiana* (SAUTUA et al., 2020b; SOARES et al., 2015). Essas doenças são de ampla ocorrência, sendo mais severas em regiões quentes, úmidas e chuvosas como no Cerrado Brasileiro. O fitopatógeno possui a capacidade de infectar todas as partes da planta, sendo os sintomas observados manchas de coloração castanha-avermelhada, crestamento em folhas e hastes, e nas sementes observa-se a coloração púrpura do tegumento, sendo este o sintoma mais característico da doença (KLINGELFUSS e YORINORI, 2001; KUDO e BLUM, 2011; SOARES et al., 2015).

As condições que favorecem o desenvolvimento de *Cercospora* é de temperaturas entre 15 e 30°C, e de molhamento foliar de pelo menos 18 horas (GODOY et al., 2007; SCHUH, 1991). Segundo Kudo, Blum e Lima (2011) temperaturas entre 20 e 24°C e umidade relativa acima de 80% intensificam os sintomas do crestamento foliar, além de ocorrer uma maior liberação de conídios, indicando que pode haver relação da severidade da doença com quantidade de conídios produzidos pelo fitopatógeno.

A capacidade desses fitopatógenos em causar danos no hospedeiro, está diretamente relacionada a produção de uma toxina chamada de cercosporina, a qual tem como função conferir patogenicidade ao fungo, sendo responsável pela evolução e agressividade da doença, devido a essa substância ser fotoativada pela luz (DAUB e EHRENSHAFT, 2000; UPCHURCH et al., 1991). A cercosporina ao ser estimulada pela luz produz espécies reativas de oxigênio (ERO's), sendo O₂ (oxigênio simples), O₂⁻ (superóxido), OH (radical hidroxila) e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) que peroxidam lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, e levam a perda da integridade da membrana celular

das plantas, ocorrendo o extravasamento do conteúdo celular, causando a morte das células. A produção da cercosporina por espécies de *Cercospora* favorece a patogênese, que contribui para a infecção e retirada de nutrientes requeridos pelo fitopatógeno para seu desenvolvimento e multiplicação no hospedeiro (AGRIOS, 2004; DAUB e EHRENSHAFT, 2000; UPCHURCH et al., 1991).

A produção de toxinas fotoativadas além de *Cercospora*, pode ser realizada por diferentes gêneros de fungos fitopatogênicos que incluem *Alternaria*, *Cladosporium*, *Elsinoe* e *Hypocrella*. Estas toxinas, pertencem ao grupo químico perilonoquinona, as quais produzem pigmento de coloração vermelha que se diferem apenas na sua estrutura química. As toxinas mais estudadas desse grupo químico, são as hipocrelinas e a cercosporina, sendo a primeira estudada para fins farmacêuticos e a última em patogênese em plantas (DAUB, HERRERO e CHUNG, 2005). A cercosporina é uma toxina não-específica produzida pelo metabolismo secundário do fungo (via dos policetídeos). A pigmentação vermelha é característica da toxina em espécies do fungo, no entanto, a coloração pode variar para roxa (púrpura) dependendo da composição do meio de cultura em que o fungo é cultivado (AGRIOS, 2004; DAUB e EHRENSHAFT, 2000).

As espécies mais frequentes que produzem cercosporina são *C. beticola*, *C. kikuchii*, *C. nicotianae*, *C. zea-maydis*, *C. coffeicola*, *C. canescens*, *C. zebrina*, *C. malvicola*, *C. personata*, *C. hayii*, *C. apii*, *C. sorghi* e *C. asparagi*. Nas espécies *C. sojina* e *C. zeina*, não produzem cercosporina, havendo a suspeita da produção de outro tipo de micotoxina (SWIDERSKA-BUREK et al., 2020).

Segundo Swiderska-Burek et al. (2020), a produção de cercosporina foi limitada às espécies do gênero *Cercospora*, porém, estudos têm demonstrado a produção dessa toxina por outros gêneros de fungos, principalmente pela classe Dothideomycetes (ascomicetes), estando relacionados os fungos *Pseudocercospora capsellae* (*Mycosphaerella*), *Stagnospora* e *Colletotrichum fioriniae*. Os autores Tabuchi, Tajimi e Ichihara (1994) destacaram a espécie *Scolecotrichum graminis* Fuckle como produtora de cercosporina. Deste modo, os autores evidenciam de que a produção de cercosporina

não é apenas específica de *Cercospora*, estando difundida em outros gêneros de fungos fitopatogênicos, podendo indicar que a origem da toxina é mais antiga do que se conhece.

A cercosporina além de ser tóxica para as plantas, também demonstra ser tóxica à fungos, oomicetos, bactérias e ratos, que se demonstram sensíveis ao composto, sendo atóxica para fungos do gênero *Alternaria* e *Cladosporium*, que são produtores de perilenoquinona fotossintetizantes (SWIDERSKA-BUREK et al., 2020). Os fungos do gênero *Cercospora* são resistentes à cercosporina, devido à capacidade de o fungo manter a toxina de forma reduzida e não tóxica nas células (DAUB, HERRERO e CHUNG, 2005; SWIDERSKA-BUREK et al., 202).

Diante dos recentes estudos envolvendo outras espécies associadas com a MPS e o CFC na cultura da soja, a hipótese é de que isolados de *Cercospora* coletados no Brasil podem ser identificados como outras espécies, sendo patogênicos à soja e com capacidade de produzir cercosporina em condições *in vitro*. Deste modo, este estudo objetivou realizar a identificação morfológica e molecular de espécies de isolados de *Cercospora* spp., assim como, comprovar a patogenicidade por meio do Postulado de Koch e quantificar a concentração de cercosporina.

3.3 Material e métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF), situada no município de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil em 2020.

3.3.1 Obtenção dos isolados de *Cercospora* spp.

Neste trabalho foram estudados 29 isolados de *Cercospora* spp. (Tabela 1), sendo 11 isolados de *Cercospora* spp. obtidos a partir do isolamento de sementes de soja com sintomas de mancha púrpura, provindas de diferentes regiões do Brasil. Para isolamento do fungo as sementes de soja foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto e após enxaguadas com água destilada esterilizada. Em seguida as sementes foram

transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA: 4 g.L⁻¹ infusão de batata, 20 g.L⁻¹ dextrose, 15 g.L⁻¹ ágar) e mantidas em câmara de crescimento (temperatura 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas) até o crescimento das estruturas do fungo para após ser obtida a colônia pura. Para a obtenção das colônias purificadas, onde fragmentos de micélio do fungo foram removidos das sementes e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar suco – V8 (20 g.L⁻¹ de ágar, 1 g.L⁻¹ de sacarose, 0,60 g.L⁻¹ de carbonato de cálcio, 0,2 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 40 g.L⁻¹ de suco V8 “Campbell”) (ALFENAS e MAFIA, 2007). Doze isolados de *Cercospora* spp. foram fornecidos pela empresa Syngenta (Código UPF C12 a UPF C23) e, outros seis isolados obtidos da Coleção de microrganismos de interesse para a agricultura da Embrapa Soja (CMES) (Código UPF C24 a UPF C29). A identificação do gênero *Cercospora* spp. foi confirmado pelas características morfológicas das estruturas fúngicas, seguindo o protocolo de Barnett e Hunter (1972).

Tabela 1 - Isolados de *Cercospora* spp. provenientes de soja de diferentes regiões produtoras do Brasil. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Código Interno	Código Isolados	Local de coleta	Ano de coleta	Origem
UPF C01	CK-01	Itaberá, São Paulo	2019	Semente
UPF C02	CK-02	Passo Fundo, Rio Grande do Sul	2020	Semente
UPF C03	CK-03	Fortaleza dos Vales, Rio Grande do Sul	2020	Semente
UPF C04	CK-05	Cruz Alta, Rio Grande do Sul	2020	Semente
UPF C05	CK-06	Castro, Paraná	2020	Semente
UPF C06	CK-07	Soledade, Rio Grande do Sul	2020	Semente
UPF C07	CK-08	Passo Fundo, Rio Grande do Sul	2021	Semente
UPF C08	CK-09	Rondonópolis, Mato Grosso	2020	Semente
UPF C09	CK-10	Muitos Capões, Rio Grande do Sul	2021	Semente
UPF C10	CK-11	Soledade, Rio Grande do Sul	2021	Semente
UPF C11	CK-12	Passo Fundo, Rio Grande do Sul	2021	Semente
UPF C12	CK-01-B	Uberlândia, Minas Gerais	2019	Folhas
UPF C13	CK-01-E	Nova Ponte, Minas Gerais	2019	Folhas
UPF C14	CK-01-H1	São Miguel do Iguçu, Paraná	2019	Semente
UPF C15	CK-01-I	Paraíso das Águas, Mato Grosso do Sul	2019	Semente
UPF C16	CK-01-K	Campo Novo do Parecis, Mato Grosso	2019	Folhas
UPF C17	CK-01-M	Candói, Paraná	2019	Semente
UPF C18	CK-01-M1	Primavera do Leste, Mato Grosso	2019	Semente
UPF C19	CK-01-N1	Júlio de Castilho, Rio Grande do Sul	2019	Semente
UPF C20	CK-01-P	Campo Alegre de Goiás, Goiás	2019	Semente
UPF C21	CK-01-R	Xanxerê, Santa Catarina	2019	Semente
UPF C22	CK-01-T	Iraí de Minas, Minas Gerais	2019	Semente
UPF C23	CK-01-V	Campo Alegre de Goiás, Goiás	2019	Semente
UPF C24	CMES 1642	Brasília, Distrito Federal	2016	-
UPF C25	CMES 1752	Alto Garças, Mato Grosso	2016	-
UPF C26	CMES 1758	Catalão, Goiás	2016	-
UPF C27	CMES 2155	Londrina, Paraná	2018	-
UPF C28	CMES 2158	Rio Verde, Goiás	2018	-
UPF C29	CMES 2159	Campo Mourão, Paraná	2018	-

3.3.2 Identificação molecular dos isolados de *Cercospora* spp.

As análises moleculares para identificação das espécies dos isolados de *Cercospora* spp. (Tabela 1) foram realizadas a partir do sequenciamento da região interna do espaçador transcrito (ITS) (WHITE et al., 1990). Para trabalho foram utilizados os primers ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Os isolados foram cultivados em meio ágar suco V8 “Campbell” por 15 dias em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. O micélio de cada isolado foi removido transferido para microtubos de 2 mL, após adicionou-se 750 μL de Nuclei Lysis Solution, para purificação do DNA genômico. Em seguida, os microtubos foram homogeneizados e centrifugados a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante de cada amostra obtida da centrifugação foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e após foi incubado a 65°C por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se 2 μL de solução de RNase, nas amostras, sendo agitadas em “vortex” e incubadas a 37°C por 15 minutos. Após o esfriamento das amostras em temperatura ambiente, procedeu-se com a adição de 200 μL de Protein Precipitation Solution, que foram agitadas em “vortex” e centrifugadas por 3 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante de cada amostra para novos microtubos de 1,5 mL contendo 600 μL isopropanol gelado. As amostras foram cuidadosamente invertidas manualmente até que fosse observado um “fio branco”, sendo este o DNA. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado, permanecendo apenas o “pellet” de coloração branca, onde foi adicionado 600 μL de álcool 70% e realizada nova centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto. Procedeu-se então, o descarte do álcool, e adicionado ao “pellet” 200 μL de DNA Rehydration Solution para reidratação do DNA. Após, o DNA obtido de cada isolado foi diluído com o acréscimo de água ultrapura e quantificado em espectrofotômetro, para a amplificação as regiões de ITS por meio da técnica de PCR (polymerase chain reaction).

As etapas da PCR para amplificar a região do ITS, consistiram primeiramente na desnaturação do DNA a 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C ,

30 segundos a 59°C para o anelamento do DNA e, depois 72°C por 5 minutos para extensão final do DNA (BAKHSI et al., 2015). Após a amplificação da PCR, os *amplicons* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% com brometo de etídio. Os géis obtidos foram fotografados com o auxílio do aparelho de fotodocumentador. O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método Sanger et al. (1977).

3.3.3 Multiplicação dos isolados de *Cercospora* spp. e preparo do inóculo para a inoculação em plantas de soja

A multiplicação da colônia de cada isolado foi realizada com o auxílio de agulha histológica esterilizada, sendo transferido disco de micélio de 8 mm para placas de Petri contendo meio nutritivo ágar suco V8 “Campbell”. Após a repicagem, as placas foram vedadas com filme plástico de parafina (Parafilm) e acondicionadas em câmara de crescimento, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por 15 dias.

Decorrido o período de crescimento micelial, procedeu-se a remoção das estruturas fúngicas (micélio e esporos) a partir da raspagem superficial das colônias com auxílio de um pincel chato n° 20 e água destilada. Desta suspensão, com auxílio de micropipetador foi transferido 0,01 mL para uma lâmina microscópica, coberta com lamínula e realizada a contagem de conídios, a partir disso, preparou-se a suspensão com densidade de 50.000 conídios/mL de água destilada e adicionou-se uma gota de espalhante adesivo Tween 20 para melhorar a distribuição do inóculo sobre as folhas de soja.

3.3.4 Teste de patogenicidade dos isolados de *Cercospora* spp. em plantas de soja

Plantas de soja do cultivar M7198 foram cultivadas em copos plásticos com capacidade de 500 mL, contendo uma mistura de solo e substrato (1:1). Após a emergência das plantas realizou-se o desbaste, mantendo-se duas plântulas por recipiente. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V4 (quarto nó visível e terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida), de acordo com a escala

de Fehr & Caviness (1977), foi realizada a aspersão da suspensão de conídios de cada isolado sobre os folíolos até o ponto de escorrimento. As testemunhas receberam apenas a pulverização de água destilada e Tween 20. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 29 isolados do fungo mais a testemunha, com quatro repetições.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento e colocadas em câmara úmida por um período de 48 horas, utilizando sacos plásticos transparentes e fotoperíodo de 12 horas. Decorrido o tempo de câmara úmida, retirou-se os sacos plásticos das plantas e foram transferidas para câmaras contendo aspersor com somente água, recebendo molhamento foliar por 1 minuto com intervalos de 8 horas, permanecendo por um período de 18 horas de molhamento foliar, para manter as condições de umidade para o desenvolvimento da doença. Posteriormente, realizou-se a observação diária das plantas até a presença ou ausência dos sintomas.

Para a comprovação da patogenicidade, procedeu-se com o reisolamento de cada isolado inoculado nas folhas que apresentaram sintomas do crestamento foliar de *Cercospora*. Folhas com sintomas da doença foram coletadas e fragmentos foram recortados e realizada a desinfestação em álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio (1%) por um minuto e após lavados com água destilada esterilizada. Na sequência, os fragmentos foram distribuídos de forma equidistante em placas de Petri contendo meio de cultura ágar suco V8 “Campbell” e posteriormente mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas até o crescimento das estruturas fúngicas. Após observou-se a morfologia geral das estruturas típicas do fungo com base nos isolados originais e literatura disponível Barnett e Hunter (1972) e Brasil (2009).

3.3.5 Teste de patogenicidade dos isolados de *Cercospora* spp. em sementes de soja

Para a inoculação dos isolados em sementes de soja, utilizou-se a cultivar BMX Ativa. As sementes foram submetidas à análise sanitária pelo teste de plaqueamento em meio de cultura BDA (BRASIL, 2009). As sementes utilizadas no estudo foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (1%) por três minutos e, na sequência enxaguadas em água destilada esterilizada e deixadas em câmara de fluxo laminar para secagem. Os isolados fúngicos foram repicados em meio de cultura ágar suco V8 “Campbell”, o qual foi incorporado manitol no potencial hídrico de -1,0 MPa, que corresponde a 73,597 g de manitol/L de água destilada (REY et al., 2008). O meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos. Após vertido em placas de Petri. Discos de micélio do fungo foram transferidos para o meio de cultura incorporado com o manitol, sendo colocado em nove pontos equidistantes em caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm de altura), após os gerbox foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por 15 dias.

Após os 15 dias, pesou-se 25 g de sementes de soja desinfestadas, as quais foram distribuídas sobre as colônias do fungo seguindo a metodologia proposta por Galli et al. (2005) com modificações. Em seguida, os gerbox foram transferidos novamente para a câmara de crescimento por um período de 56 horas para que ocorresse a infecção das sementes pelo fungo. Durante o período de incubação, as sementes inoculadas foram retiradas dos gerbox e colocadas em bandejas contendo papel germinação por 48 horas para secagem.

Após a secagem das sementes, foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA para realização do teste de análise de sanidade, identificação das estruturas e morfologia geral do fungo e, porcentagem de sementes germinadas, após cinco dias de incubação em câmara de crescimento. As sementes utilizadas como testemunhas foram apenas desinfestadas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 29 isolados do fungo mais testemunha, com quatro repetições. Para o teste de germinação das sementes infectadas os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a uma probabilidade de 5% de erro. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados por Box-cox pois, o teste de Shapiro-Wilk foi significativo (valor- $p < 0,05$). Para as análises estatísticas utilizou-se o software RStudio versão 1.2.5033 (RCORE TEAM, 2020).

3.3.6 Extração e quantificação da cercosporina de isolados de *Cercospora* spp.

Para a determinação da concentração de cercosporina por meio de espectrofotometria seguiu-se a metodologia proposta por Almeida et al. (2005) com modificações. Os isolados fúngicos em estudo foram cultivados em meios de cultura ágar suco V8 “Campbell” em câmara de crescimento por durante 15 dias em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Discos de micélio de 8 mm de diâmetro foram recortados das bordas das colônias, sendo transferidos dois discos para tubos de ensaio contendo 16 mL de solução de 5 N KOH, mantidos no escuro por quatro horas em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As amostras foram agitadas em Vortex por alguns segundos e após deixadas em repouso por cinco minutos para que os discos do micélio se depusessem no fundo e não interferir na análise. Na sequência procedeu-se com a leitura das amostras em espectrofotômetro da absorbância a 480 nm (absorbância máxima visível de cercosporina), utilizou-se um coeficiente de extinção molar (capacidade que um mol de uma substância possui em absorver luz a um determinado comprimento de onda) de 23.300 (ALMEIDA et al. 2005).

3.4 Resultados e discussão

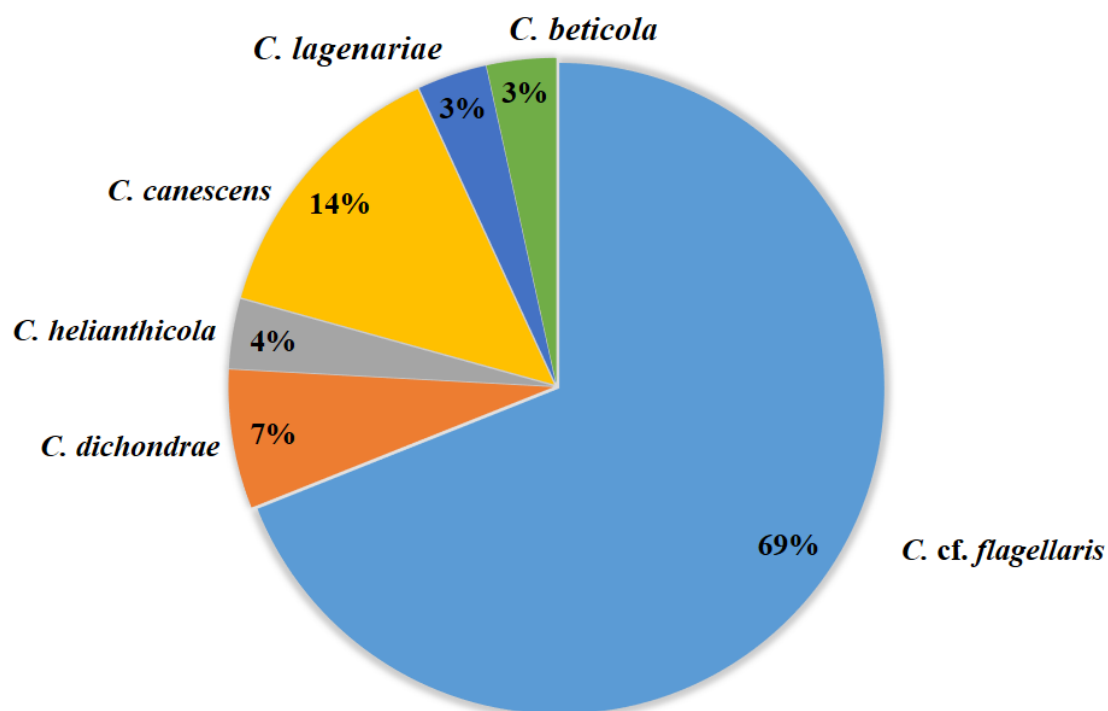
3.4.1 Identificação molecular dos isolados de *Cercospora* spp.

Entre os 29 isolados avaliados nesse estudo, a espécie com maior frequência entre os isolados foi *C. cf. flagellaris* (69%, n= 20), seguida da espécie *C. canescens* (14%, n= 4), *C. dichondrae* (7%, n= 2), *C. helianthicola* (4%, n= 1), *C. beticola* (3%, n= 1) e *C. lagenariae* (3%, n= 1) (Figura 4). Porém, a espécie *C. kikuchii* não foi identificada.

Esse estudo corrobora com Satua et al. (2019; 2020b), onde identificou diversas espécies de *Cercospora*, sendo as espécies *C. nicotianae* e *C. cf. flagellaris*, a mais frequentes. Soares et al. (2015) também identificou a espécie *C. cf. flagellaris*, além da espécie *C. cf. sigesbeckiae*, que são citadas como as mais recorrentes nas regiões produtoras de soja. Segundo Zivanovic et al. (2021) e Albu et al. (2016) a espécie *C. cf. flagellaris* é a predominante e o principal agente causal do CFC na Lousiana (Estados Unidos).

Sautua (2021) realizou uma análise filogenética de isolados de *Cercospora*, identificando *C. kikuchii* (78%) como a espécie predominante na Argentina, as espécies *C. richardiicola*, a qual é polifilética com *C. sigesbeckiae*, e *C. nicotianae* também foram identificadas. Na Bolívia cerca de 38% do isolados pertenciam a espécie *C. nicotianae* e 19% a espécie *C. kikuchii* (SAUTUA, 2021).

Figura 4 - Identificação molecular de isolados de *Cercospora* spp. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

A identificação taxonômica de espécies de fungos a partir da amplificação e sequenciamento da região ITS, do DNA ribossomal (rDNA) pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) é muito utilizada. A região do ITS é conhecido por ter sequências de genes altamente conservadas na espécie, mas variável entre espécies de fungos. Os resultados obtidos a partir da amplificação dessa sequência de genes são confiáveis, mas para uma melhor separação entre as espécies de fungos, se faz necessária a amplificação de mais regiões do DNA para uma melhor análise filogenética das espécies (LUPATINI et al., 2008; MENEZES et al., 2010; WHITE et al., 1990). Sautua (2021) em seu estudo realizou a identificação de espécies de *Cercospora* analisando sete locais de sequências de genes, sendo actina (*actA*), calmodulina (*cmdA*), região interna do espaçador transcrito (*nrITS*), histona H3 (*his3*) gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*), beta tubilina (*tub2*) e fato de alongamento da tradução 1-a (*tef1*)

3.4.2 Patogenicidade de isolados de *Cercospora* spp. em plantas de soja

Todos os 29 isolados em estudo foram patogênicos à soja. As plantas inoculadas com os isolados começaram a evidenciar os sintomas iniciais de crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) entre cinco e sete dias após a inoculação. As plantas utilizadas como testemunha não apresentaram sintomas da doença. A severidade para esse estudo não foi avaliada, sendo apenas observada a presença (incidência) e descrição dos sintomas da doença pois, parte das plantas inoculadas os sintomas de CFC iniciaram nas folhas unifolioladas da soja e não progrediram para os trifólios.

Os sintomas da doença iniciaram com pequenas pontuações de coloração castanho-avermelhadas, algumas folhas apresentaram apenas coloração avermelhada, como se fosse o bronzeamento característico visualizado em plantas nas áreas de cultivo (Figura 5). Primeiramente foram observados os sintomas nas folhas unifolioladas da soja. Aos 10 dias após a inoculação, algumas das folhas apresentaram sintomas de crestamento, a coloração foi tornando-se púrpura. Vinte e um dias após a inoculação ocorreu progressão da doença em algumas plantas, observou-se pontuações e pequenas manchas de coloração castanho-avermelhadas de formato irregular e crestamento. Algumas manchas foliares apresentaram-se muito semelhantes com sintomas da mancha olho de rã (*C. sojina*), sintomas descritos por Sautua et al. (2020b) em seu estudo com a espécie *C. cf. nicotianae*, que comprovou ser outra espécie causadora do CFC em soja.

Cai (2004) realizou estudo de patogenicidade de isolado de *C. kikuchii* em plantas de soja e observou sintomas semelhantes aos encontrados em plantas no campo, como pequenas manchas de coloração roxa-avermelhadas, os quais surgiram entre 6 a 7 dias após a inoculação. Ainda como resultado do estudo, o autor observou manchas foliares que progrediram mais tarde para lesões irregulares, com presença de necrose e leve aspecto coriáceo de coloração púrpura e cor acastanhado e, os pecíolos apresentaram necrose e lesões.

Nesse estudo não foi observado sintomas em pecíolos nem hastes. A maior intensidade e severidade dos sintomas foi observado nas folhas cotiledonares

unifolioladas, assim como observado nesse estudo, foram as primeiras a exibir os sintomas de CFC e a senescer. No estudo conduzido por Alloatti et al. (2015) os sintomas se caracterizaram por uma extensa coloração púrpura nas folhas, vagens e caules. Os sintomas observados nas plantas de soja inoculadas artificialmente com os isolados, corroboram com os sintomas característicos do crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) descritos na literatura e que foram observados por outros autores.

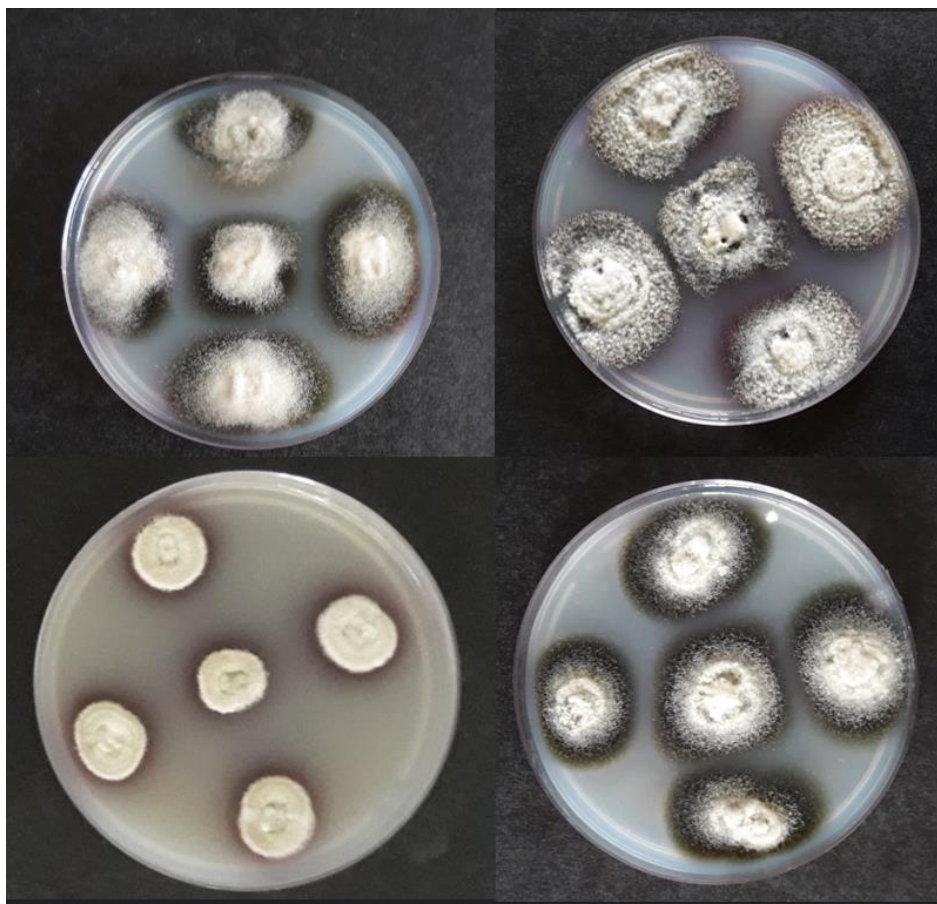
Figura 5 - Sintomas de crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) em soja, inoculada artificialmente com o fungo *Cercospora* spp. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

A partir dos fragmentos das folhas sintomáticas incubadas, foi possível observar as estruturas fúngicas de *Cercospora* spp., após cinco dias de incubação em câmara de crescimento (Figura 6). A morfologia da colônia apresentou crescimento uniforme com micélio superficial, denso de coloração que varia do branco a acinzentado, envolto por um halo de cor púrpura a verde oliva escuro, produção do pigmento cercosporina, que se destaca no fundo da placa de Petri, variando entre os isolados.

Figura 6 - Formação das colônias do fungo *Cercospora* spp. obtidas a partir do reisolamento de fragmentos de folhas de soja com sintomas do crestamento foliar de *Cercospora* (CFC). FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Os conídios observados em microscópio óptico caracterizaram-se por serem longos, hialinos e septados em formato de agulha (aciculados), retos ou curvados, os conidióforos septados apresentaram coloração marrom-escura (Figura 7). Sautua et al. (2020b) observaram conídios hialinos, retos em formato de agulha e septados, com conidióforos marrons escuros, septados com a parede espessa, retos ou geniculados (curvados).

Figura 7 - Estruturas fúngicas de *Cercospora* spp. ao microscópio óptico (A 400x). **A** – Conídio aderido ao conidióforo; **B** – Conidióforos em esporodóquio; **C** – Conídio; **D** – Conidióforo. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

As estruturas fúngicas observadas apresentam a morfologia idêntica ao gênero *Cercospora* descrito na literatura, sendo de conídios longos, retos ou curvos, hialinos, aciculares e septados (2 a 49 septos), medindo 50 – 375 x 2,5 – 5 µm, ao quais apresentam-se aderidos aos conidióforos, medindo 45 – 220 x 4 – 6 µm, sendo este uma hifa fértil que formam os conídios, apresentam coloração marrom-escura (ANDRADE, 2016; GOULARTE, 2018; PRICE, 2013).

Portanto, foi confirmada a patogenicidade dos isolados de *Cercospora* spp., pelos sintomas observados de cretamento foliar de *Cercospora*, morfologia da colônia, micélio, conídios e conidióforos, através da comparação da descrição de outros estudos e materiais disponíveis na literatura.

3.4.3 Patogenicidade de isolados de *Cercospora* spp. em sementes de soja

Todos os 29 isolados do fungo foram patogênicos quando inoculado em sementes de soja. No teste de sanidade, observou-se a coloração púrpura do tegumento das sementes de soja, sintoma característico da mancha púrpura da semente, assim como os sinais do fitopatógeno, sendo observada a formação de micélio, conidióforos e conídios nas sementes e em torno destas (Figura 8).

A porcentagem de germinação das sementes inoculadas diferenciou-se entre alguns isolados, mas não reduziu significativamente a germinação (Tabela 2). Segundo Brasil (2009), as sementes de modo geral podem abrigar diferentes espécies de fungos fitopatogênicos, que podem vir a causar a deterioração das sementes e/ou tornar as sementes uma fonte de inóculo inicial de doenças nas áreas de cultivo. As espécies necrotróficas de fungos, como no caso de *Cercospora*, em sua maioria são associados às sementes e, podem ser facilmente identificadas a partir dos sintomas observados e pela formação das estruturas típicas do fungo.

A partir do teste de sanidade das sementes inoculadas foi possível observar os sintomas típicos da mancha púrpura, caracterizada pela coloração arroxeadada do tegumento das sementes, assim como, a formação e tipo da colônia quanto a coloração,

textura, morfologia geral. Observaram-se os sinais do fitopatógeno após três dias de incubação das sementes inoculadas em meio de cultura BDA, e com cinco dias de incubação as colônias apresentaram-se mais características da espécie *Cercospora*, sendo micélio superficial e denso, de coloração que variou entre acinzentado, púrpura e marrom oliváceo, ao redor das sementes observou-se a formação do halo de cor púrpura, característico da doença (Figura 8).

Figura 8 - Sintomas da mancha púrpura da semente (MPS) e sinais do fungo *Cercospora* spp., em inoculação do fitopatógeno em sementes de soja. FAMV/UPF. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Segundo Cai e Schneider (2009) e Xue et al. (2008) a infecção do fungo nas sementes de soja está correlacionada com as proporções de ácido linolênico e ácido oleico presentes nas sementes. Os autores Goulart (2018) e Brasil (2009) descreveram que o sintoma mais evidente da presença do fungo são manchas de coloração roxa nas sementes, mas nem todas as sementes que apresentam essa coloração pode apresentar o fungo, ou ainda que, sementes aparentemente saudáveis podem não apresentar a coloração púrpura, mas estarem infectadas pelo fitopatógeno. Somente o teste de sanidade pode comprovar a presença ou não do fitopatógeno. Quando presente o micélio é superficial,

moderadamente denso, com coloração variável de marrom oliváceo, cinza a púrpura, com a formação de um halo no substrato ao redor das sementes, as colônias apresentam coloração púrpura típica e podem ser observados os conídios e conidióforos em esporodóquio.

Tabela 2 - Porcentagem de germinação (G%) de sementes de soja, cultivar BMX Ativa, inoculadas com isolados do fungo *Cercospora* spp. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Isolados (Código)	Espécie	G%
UPF C01	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	76 bcdef
UPF C02	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	83 abcde
UPF C03	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	82 abcde
UPF C04	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	91 abcd
UPF C05	<i>Cercospora dichondrae</i>	61 ef
UPF C06	<i>Cercospora helianthicola</i>	88 abcd
UPF C07	<i>Cercospora langenariae</i>	94 ab
UPF C08	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	89 abcd
UPF C09	<i>Cercospora beticola</i>	73 cdef
UPF C10	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	87 abcd
UPF C11	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	88 abcd
UPF C12	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	57 f
UPF C13	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	59 f
UPF C14	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	95 ab
UPF C15	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	99 a
UPF C16	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	79 bcdef
UPF C17	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	79 bcdef
UPF C18	<i>Cercospora canescens</i>	72 cdef
UPF C19	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	92 abc
UPF C20	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	87 abcd
UPF C21	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	88 abcd
UPF C22	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	71 def
UPF C23	<i>Cercospora dichondrae</i>	89 abcd
UPF C24	<i>Cercospora canescens</i>	76 bcdef
UPF C25	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	89 abcd
UPF C26	<i>Cercospora canescens</i>	92 abc
UPF C27	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	78 bcdef
UPF C28	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	88 abcd
UPF C29	<i>Cercospora canescens</i>	93 ab

Coefficiente de variação = 16,87%.

Quanto a porcentagem de sementes germinadas, as sementes inoculadas com os isolados UPF C12 (*C. cf. flagellaris*) e UPF C13 (*C. cf. flagellaris*) foram as que tiveram a menor porcentagem de germinação, sendo 57 e 59% respectivamente, enquanto que os demais tiveram uma germinação entre 70 e 99% de germinação (Tabela 2).

Os autores Turner et al. (2020) observaram que em sementes não infectadas pelo fitopatógeno, a germinação e vigor foram muito maior em comparação com as infectadas, as quais tiveram um impacto na sanidade e qualidade das sementes, na germinação e vigor, principalmente na composição das sementes de proteínas, açúcares e alguns aminoácidos.

Galli et al. (2005) realizaram testes de inoculações de *C. kikuchii* em sementes de soja, ao avaliar a germinação não constataram diferença na germinação entre sementes infectadas e com o padrão mínimo de qualidade de sementes de soja que é de 80%, os níveis de infecção pelo fitopatógeno foram de 40 a 60% e a germinação de sementes foi de 72 a 79%. Velicheti et al. (1992) também não observaram redução da germinação ou efeitos negativos em plântulas de soja infectadas por *C. kikuchii*, constatou-se apenas a degradação das proteínas do tegumento das sementes com mancha púrpura.

Sautua (2021) semeou sementes com sintomas da mancha púrpura e sementes assintomáticas, e obteve uma germinação superior a 80% tanto para as sementes sintomáticas quanto assintomáticas. Segundo Galli et al. (2005) os efeitos de *C. kikuchii* na qualidade fisiológica das sementes ainda são conflitantes, havendo divergências entre os resultados pois, em experimentos semelhantes houve redução da porcentagem de germinação de sementes em até 40%, mas em outros experimentos, a incidência de sementes infectadas pelo fitopatógeno não demonstraram efeito negativo na germinação das sementes.

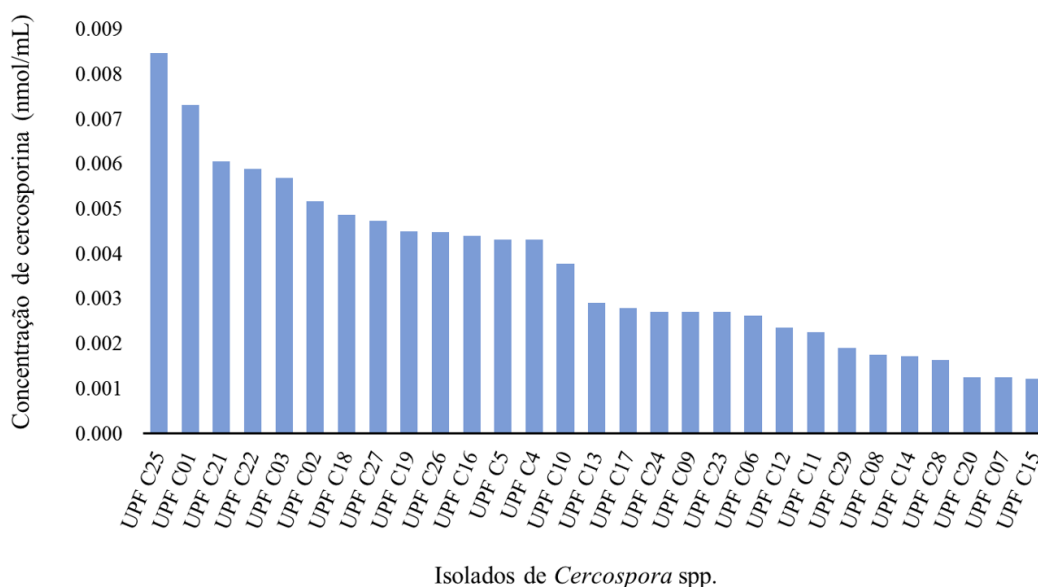
Diante disso, a extensão dos efeitos do fitopatógeno na germinação da semente está relacionada com a agressividade do isolado em colonizar os tecidos das sementes, com a espécie de *Cercospora* recorrente e, tendo em vista a ocorrência de diferentes espécies de *Cercospora* associadas à MPS e ao CFC, assim como o local de infecção pelo

fungo, se é superficial no tegumento da semente, ou próximo da região do eixo embrionário e, ainda quanto a suscetibilidade dos genótipos de soja.

3.4.4 Extração e quantificação de cercosporina de isolados de *Cercospora* spp.

A concentração de cercosporina variou entre os isolados (Figura 9). A cercosporina é uma toxina não específica produzida por espécies de *Cercospora*, sendo isolada pela primeira vez na espécie *C. kikuchii*, estando envolvida com a severidade dos sintomas em soja. A toxina é ativada pela luz, que induz a produção espécies reativas de oxigênio (ERO's) que são capazes de degradar os lipídios presentes nas membranas das células, causando extravazamento do conteúdo celular e por consequência morte celular. A produção da cercosporina pelas espécies de *Cercospora* contribui para a infecção e retirada de nutrientes requeridos pelo fitopatógeno para seu desenvolvimento e multiplicação no hospedeiro (DAUB e EHRENSHAFT, 2000; UPCHURCH et al., 1991).

Figura 9 - Concentração de cercosporina dos isolados de *Cercospora* spp. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Upchurch et al. (1991) foi o primeiro autor a relatar a cercosporina como uma toxina envolvida na patogenicidade de *C. kikuchii*, demonstrando que isolados que não

produziam a toxina não foram capazes de causar sintomas em folhas de soja, estando a produção de cercosporina estritamente relacionada com a patogenicidade do fungo. Almeida et al. (2005) encontrou valores de cercosporina entre os isolados que variaram de 0,3 a 41 nmol/mL, que isolados com baixos valores de concentração de cercosporina foram virulentos quando inoculados em plantas e em sementes de soja, mas aqueles que produziram mais cercosporina eram mais agressivos.

Nesse estudo, apesar de baixas concentrações de cercosporina terem sido encontradas, os resultados da patogenicidade comprovam que todos os isolados foram capazes de reproduzir os sintomas de mancha púrpura da semente e do crestamento foliar de *Cercospora* em soja.

3.5 Conclusões

Nesse estudo, a espécie mais recorrente foi *C. cf. flagellaris*, seguida da espécie *C. canescens* e, respectivamente as espécies *C. dichondrae*, *C. helianthicola*, *C. beticola* e *C. lagenariae* com menor frequência. Nenhuma espécie de *C. kikuchii* foi identificada.

Foi comprovada a patogenicidade dos isolados de *Cercospora* spp. a partir dos Postulados de Koch. Quanto a cercosporina, todos os isolados produziram a toxina e a concentração variou entre os isolados do fungo. A porcentagem de germinação de sementes infectadas para a maioria dos isolados não foi afetada.

4 CAPÍTULO II

Meios de cultura para o crescimento micelial e esporulação de *Cercospora cf. flagellaris*

4.1 Resumo

O agente causal mais comumente da mancha púrpura da semente (MPS) e do crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) é o fungo *Cercospora kikuchii*. Contudo, outras espécies estão sendo associadas à MPS e ao CFC, sendo mais frequentes as espécies *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. cf. nicotianae*. A dificuldade em multiplicar esses fitopatógenos em laboratório está relacionada ao lento crescimento micelial e escassa ou nenhuma esporulação de espécies do gênero *Cercospora*. Desse modo, identificar meios de cultura que visam desenvolver as estruturas fúngicas de espécies de *Cercospora* é de suma importância para o estudo da sua biologia e epidemiologia da MPS e do CFC. Assim, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito de diferentes meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Cercospora cf. flagellaris*. Para isso, foram utilizados dois isolados do fungo, identificados com os códigos 01 e 13, e sete meios de cultura, sendo BDA natural (BDA), PDA sintético (PDA), ágar suco V8 “Campbell” (AV8), ágar czapek (ACZ), ágar extrato de folha de soja (AEFS), ágar semente de soja (ASS) e ágar aveia (AAV). Os meios de cultura foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos e os meios AAV e ASS por 30 minutos. Após solidificação dos meios de cultura, os isolados foram repicados nos respectivos meios e incubados em câmara de crescimento (temperatura 25 °C ± 2 e fotoperíodo de 12 horas) até que a colônia do fungo ocupasse toda a área da placa de Petri. As avaliações da mensuração das colônias foram realizadas a cada três dias e após calculou-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a taxa de crescimento diário (TxC), e ao final realizou-se a contagem de conídios total. O meio de cultura AAV proporcionou maior IVCM e TxC para ambos os isolados, sendo IVCM de 7,70 e 8,08 e, TxC de 3,20 mm/dias respectivamente para os isolados UPF C01 e UPF C12. Para a esporulação os meios de cultura que obtiveram os maiores valores foram o ACZ (14.750 e 12.950 conídios/mL), AAV (13.600 e 14.950), AV8 (13.250 e 6.100) e AEFS (12.600 e 14.250), respectivamente para os isolados UPF C01 e UPF C12. Desse modo, os meios de cultura BDA, PDA e AVV obtiveram maiores IVCM e TxC para ambos os isolados e, por fim, a maior esporulação foi obtida com os meios de cultura ACZ, AVV, AV8 e AEFS.

Palavras-chave: 1. Mancha púrpura da semente. 2. Crestamento de *Cercospora*. 3. Meios de cultura. 4. Fungo. 5. Estruturas fúngicas.

4.2 Introdução

A mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC), são doenças que se encontram disseminadas nas principais regiões produtoras de soja no Brasil. O agente causal comumente relacionado a essas doenças é o fungo *Cercospora kikuchii* (Mats. & Tomoy.) Gardner. Contudo, estudos recentes demonstraram a existência de outras espécies associadas a essas doenças, sendo *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. cf. nicotianae* (SOARES et al., 2015; SAUTUA et al., 2020b). Esses fitopatógenos são fungos necrotróficos, polífagos e cosmopolitas, que possuem a capacidade de infectar todas as partes da planta. Os sintomas observados são manchas de coloração castanha-avermelhada, crestamento em folhas e hastes, nas sementes observa-se a coloração púrpura do tegumento, sendo este o sintoma mais característico da doença (KLINGELFUSS e YORINORI, 2001; KUDO e BLUM, 2011; SOARES et al., 2015).

A capacidade desses fitopatógenos em causar danos no hospedeiro, está relacionada com a cercosporina, uma toxina produzida pelo próprio fungo, a qual é responsável pela agressividade e severidade dos sintomas da doença. A cercosporina é fotoativada pela luz e ao ser estimulada pela luz, induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), que peroxidam lipídios levando ao extravasamento do conteúdo celular e rompimento da membrana celular das plantas, causando a morte das células. A produção da cercosporina pelas espécies de *Cercospora* contribui para a infecção e retirada de nutrientes requeridos pelo fitopatógeno para seu desenvolvimento e multiplicação no hospedeiro (DAUB e EHRENSHAFT, 2000; UPCHURCH et al., 1991).

As espécies de *Cercospora*, de maneira geral, quando isoladas de partes de plantas sintomáticas em laboratório e cultivadas em meio de cultura nutritivo, apresentam crescimento lento e baixa ou nenhuma esporulação. Diversos fatores podem induzir ou inibir o crescimento vegetativo e reprodutivo de espécies de fungos, estando a temperatura e a luminosidade entre os mais importantes. A temperatura é responsável

pela produção de proteínas e enzimas que realizam a manutenção da célula fúngica, para *Cercospora* temperaturas entre 25 e 27°C são satisfatórias para o desenvolvimento do fungo. A intensidade luminosa está relacionada com a produção das estruturas reprodutivas, induzindo ou inibindo, embora algumas espécies se apresentem indiferentes quanto a presença ou não de luz para produzir esporos. Espécies de *Cercospora* quando incubadas sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro proporcionaram a esporulação (BRUNELLI et al., 2006; LOMBARDI, 2002; SOARES, 2003).

Apesar de existirem diferentes espécies de *Cercospora* conhecidas, poucas são cultivadas artificialmente e estudadas sua fisiologia, devido o consenso de que essas espécies de fungo possuem o crescimento lento e escassez ou até ausência de esporulação, o que dificulta o desenvolvimento de trabalhos com esses fungos para entender sua biologia e epidemiologia da doença. (MELLO, ÁVILA e BORGES NETO, 2014).

Desse modo, a composição do meio de cultura influencia o crescimento, a morfologia e a esporulação de diversos fungos fitopatogênicos. O substrato deve conter todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento das estruturas fúngicas, entre os principais componentes estão as fontes de carbono e energia, que são os açúcares, nitrogênio, fósforo e sais minerais (CAROLLO e SANTOS FILHO, 2016).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de isolados de *Cercospora cf. flagellaris*.

4.3 Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAMV da Universidade de Passo Fundo, no município de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, em 2020.

Foram utilizados dois isolados de *Cercospora cf. flagellaris*, identificados com o código UPF C01 e UPFC12. Ambos os isolados foram cultivados em meio de cultura

ágar suco V8 “Campbell” por 15 dias em câmara de crescimento, a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas para multiplicação da colônia do fungo.

Foram utilizados sete meios de cultura (Tabela 3): BDA natural (BDA), PDA sintético (PDA), ágar suco V8 “Campbell” (AV8), ágar czapek (ACZ), ágar extrato de folha de soja (AEFS), ágar semente de soja (ASS) e ágar aveia (AAV). Os meios de cultura foram preparados e colocados em Erlenmeyers e adicionado 1 litro de água destilada, após o preparo, os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 20 minutos, com exceção dos meios de cultura AAV e ASS que passaram por autoclavagem de 30 minutos, para melhor esterilização da farinha de aveia e das sementes de soja pois, são meios de cultura que geralmente contaminam facilmente por contaminantes do ar.

Tabela 3 - Composição dos meios de culturas utilizados para avaliar o crescimento micelial e esporulação de *Cercospora* spp. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Meios de cultura	Código	Composição dos meios de cultura (g.L⁻¹)
BDA natural	BDA	200 g de batata, 12 g de ágar, 20 g de sacarose
PDA sintético Merck	PDA	39 g PDA marca Merck (4 g infusão de batatas, 20 g de glicose, 15 g de ágar)
Ágar Suco V8 "Campbell"	AV8	20 g de ágar, 1 g de sacarose, 0,2 g de extrato de levedura, 0,6 g de carbonato de cálcio (CaCO ₃), 40 g suco V8 "Campbell"
Ágar Czapek Kasvi	ACZ	49 g Czapek (2,0 g de nitrato de sódio, 0,5 g de sulfato de magnésio, 0,5 de cloreto de potássio, 0,01 g de sulfato ferroso, 1,0 g fosfato dipotássico, 30 g de sacarose, 15 g de ágar)
Ágar Extrato de folha de soja	AEFS	200 g de folhas frescas de soja, 10 g de sacarose, 20 g de ágar
Ágar Semente de soja	ASS	40 g de sementes de soja trituradas, 20 g de ágar
Ágar Aveia	AAV	40 g de farinha de aveia marca Quaker, 12 g de ágar

Após a esterilização, em uma câmara de fluxo laminar os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri. Após o esfriamento e solidificação dos meios, discos de micélio de cada isolado de *Cercospora* cf. *flagellaris* com 8 mm de diâmetro foram depositados no centro da placa e incubados em câmara de crescimento, a temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas.

Para a quantificação da esporulação, foram retirados dois discos de micélio de 8 mm de diâmetro de cada meio de cultura após 24 dias (última avaliação de crescimento micelial). Os discos de micélio de cada tratamento foram depositados em tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada esterilizada e uma gota de acetona pura, para paralisar o desenvolvimento dos conídios. A partir dessa suspensão obtida, foi retirada uma alíquota de 10 µL com o auxílio de um micropipetador, e transferida para uma lâmina de microscopia coberta por uma lamínula, então, foi realizada a quantificação do número de conídios em microscópio óptico. O procedimento foi realizado quatro vezes para cada unidade experimental e a média destes foi utilizada para a contagem final de conídios/mL.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, composto por 7 diferentes meios de cultura e dois isolados de *Cercospora cf. flagellaris* (7 x 2), com quatro repetições e unidade experimental uma placa de Petri. As avaliações foram realizadas a partir da mensuração perpendicularmente do diâmetro das colônias do fungo, com o auxílio de um paquímetro digital, a cada três dias, até que o micélio do fungo encostasse na borda da placa de Petri. Para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) utilizou-se a fórmula de Maguire (1962) adaptado por Oliveira (1991): $IVCM = \sum (D - D_a) / N$, sendo ICVM – índice de velocidade de crescimento micelial, D – diâmetro médio atual, D_a – diâmetro médio do dia anterior e, N – número de dias após a inoculação. A taxa de crescimento foi calculada pela fórmula $T_x = D_f / N$, sendo, T_x - taxa de crescimento diário mm/dia, D_f – diâmetro final da colônia, N – número de dias após a inoculação.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a uma probabilidade de 5% de erro. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa de software RStudio versão 1.2.5033 (RCORE TEAM, 2020).

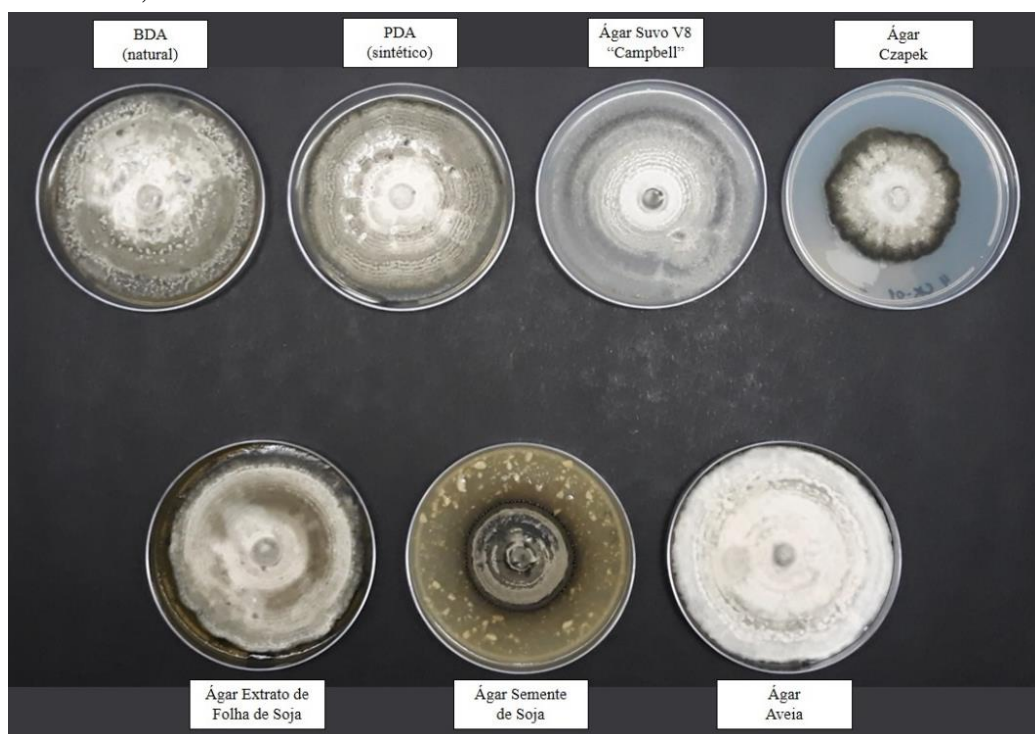
4.4 Resultados e discussão

O crescimento micelial de *Cercospora cf. flagellaris* ocorreu em todos os meios de cultura testados ocorrendo variações entre os meios de cultura. Houve interação significativa entre meios de cultura e isolados. O crescimento micelial dos isolados UPF

C01 e UPF C12 de *Cercospora cf. flagellaris*, variou entre os meios de cultura e, as colônias do fungo levaram 24 dias para preencher todo o espaço da placa de Petri, apenas para o meio de cultura ágar aveia (AAV).

Observaram-se variações fenotípicas das colônias do fungo de acordo com os meios de cultura para ambos os isolados (Figuras 10 e 11). O micélio das colônias apresentou-se superficial para todos os meios de cultura, já o meio ACZ o micélio além de ser superficial, parece se desenvolver entre o substrato, lembrando a formação de raízes de plantas. A coloração das colônias de ambos os isolados variaram entre o branco a acinzentada, o meio ACZ apresentou um halo em volta da colônia de coloração verde oliva.

Figura 10 - Crescimento micelial das colônias do isolado UPF C01 de *C. cf. flagellaris*, em diferentes meios de cultura após 24 dias da incubação. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Figura 11 - Crescimento micelial das colônias do isolado UPF C12 de *C. cf. flagellaris*, em diferentes meios de cultura após 24 dias da incubação. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

A produção de cercosporina pelos isolados foi visível em todos os meios de cultura, no entanto, os meios de cultura AV8 e AVV foram mais evidentes a pigmentação que variou de púrpura para avermelhada. O meio de cultura ASS com o decorrer dos dias, as colônias tornaram-se com aspecto úmido e micélio ralo e, a coloração passou para um tom cinza escuro a marrom escuro. Daub e Ehrenshaft (2000) citaram que a produção de cercosporina é influenciada pela composição do meio de cultura, da temperatura e luz, que as condições ideais são específicas do isolado.

O crescimento micelial e a esporulação em espécies de *Cercospora* spp. quando cultivadas em meios de cultura *in vitro*, apresentam crescimento lento e baixa esporulação de conídios, mesmo em condições favoráveis para o desenvolvimento das estruturas fúngicas, o que corrobora com outros estudos (BRUNELLI et al., 2006, MELLO, ÁVILA e BORGES NETO, 2014; LOMBARDI, 2002) envolvendo espécies de *Cercospora*. Andrade et al. (2015) classificaram a velocidade do crescimento micelial como rápida

quando for menor que sete dias, intermediária entre 8 a 14 dias e lento para mais que 14 dias.

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) quando comparado os meios de cultura dentro dos níveis de cada isolado (Tabela 4). O BDA apresentou maior IVCM para o isolado UPF C01, seguido do meio AAV, que não diferiu dos meios PDA e AEFS e, o meio AV8. Os menores IVCM foram dos meios de cultura ACZ e ASS. Para o isolado UPF C12 o maior IVCM foi do meio de cultura AAV, seguido dos meios BDA, PDA e AEFS, e após os meios AV8 e ACZ, o menor IVCM foi do meio de cultura ASS.

Ao comparar os isolados dentro de cada nível dos meios de cultura (Tabela 4), o IVCM do meio de cultura BDA foi maior para o isolado UPF C01 do que para o isolado UPF C12. Para o meio de cultura AAV o IVCM não diferiu entre os isolados, assim como para os meios de cultura PDA e ASS. O meio de cultura AEFS apresentou maior IVCM para o isolado UPF C01 do que para o isolado UPF C12. O AV8 apresentou maior IVCM para o isolado UPF C01 quando comparado ao isolado UPF C12. O IVCM do meio ACZ foi maior para o isolado UPF C12 do que para o isolado UPF C01.

Tabela 4 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados UPF C01 e UPF C12 de *C. cf. flagellaris*, em diferentes meios de cultura. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Meios de cultura	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)		
	Isolados		
	UPF C01	UPF C12	Média
BDA Natural	8,13 a A	7,29 b B	7,71
Ágar Aveia	7,70 ab A	8,08 a A	7,89
PDA Sintético	7,36 b A	6,98 b A	7,17
Ágar Extrato Folha de Soja	7,35 b A	6,75 b B	7,05
Ágar Suco V8	6,54 c A	5,97 c B	6,26
Ágar Czapek	4,43 d B	5,64 c A	5,04
Ágar Semente de Soja	3,89 d A	3,69 d A	3,79
Média	6,49	6,35	6,42

Coeficiente de variação = 5,06%.

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A taxa de crescimento diário (mm/dia) variou entre os meios de cultura e os isolados (Tabela 5). Para o isolado UPF C01 a maior taxa de crescimento micelial foi alcançada com o meio de cultura AAV, seguido dos meios de cultura BDA e PDA, que não diferiu do meio AEFS e AV8, as menores taxas de crescimento foram dos meios de cultura ACZ e ASS. O isolado UPF C12 apresentou maior taxa de crescimento micelial com o meio de cultura AAV, seguido dos meios BDA, PDA e ACZ que não diferiram entre si e, o meio de cultura AEFS. As menores taxas de crescimento diário foram dos meios de cultura AV8 e ASS.

Tabela 5 - Taxa de crescimento micelial diário (mm/dia) dos isolados UPF C01 e UPF C12 de *C. cf. flagellaris*, em diferentes meios de culturas. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Meios de cultura	Taxa de Crescimento (mm/dia)		
	Isolados		
	UPF C01	UPF C12	Média
Ágar Aveia	3,208 a A	3,208 a A	3,208
BDA Natural	2,897 b A	2,692 bc B	2,794
PDA Sintético	2,893 bc A	2,789 b A	2,841
Ágar Extrato Folha de Soja	2,871 c A	2,615 cd B	2,743
Ágar Suco V8	2,686 c A	2,533 d B	2,610
Ágar Czapek	1,753 d B	2,364 bc A	2,058
Ágar Semente de Soja	1,023 e A	1,026 e A	1,024
Média	2,476	2,461	2,468

Coefficiente de variação = 4,05%

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os autores Mello, Ávila Borges Neto (2014), relataram que resultados sobre crescimento micelial e esporulação de fungos fitopatogênicos encontrados na literatura são bastante variados, principalmente quando está relacionado ao cultivo *in vitro* de *Cercospora* spp. Que diferentes respostas dos fitopatógenos aos meios de cultura, assim como exposição a temperatura e fotoperíodo, pode ser atribuída à variabilidade existente entre os isolados.

Dentre os meios de cultura avaliados nesse estudo, o meio AAV foi aquele em que as colônias do fungo preencheram a área da placa de Petri mais rapidamente, seguido dos

meios BDA e PDA. Apesar de se obter um maior crescimento micelial com o meio AAV, o preparo desse meio é mais trabalhoso e também é um meio que contamina mais facilmente em relação aos outros meios de cultura, o meio AAV antes de ser autoclavado, deve passar pelo processo de decocção, obtendo-se um “mingau” de aveia para então ser misturado ao restante dos ingredientes para elaboração do meio de cultura. Outro ponto importante para o cultivo de *Cercospora* em laboratório é que a marca comercial do meio de cultura sintético como o PDA, também é um fator influência no crescimento do fungo, algumas marcas não favorecem o desenvolvimento do fungo após 10 dias de incubação.

Todos os meios de cultura produziram esporos, porém em quantidades variadas (Tabela 6). Os meios de cultura ACZ, AAV, AV8 e AEFS produziram maior número de conídios para o isolado UPF C01, seguido dos meios de cultura BDA, ASS e PDA, que produziram baixo número de conídios. Para o isolado UPF C12 os meios de cultura que produziram maior número de conídios foram AAV, AEFS, seguido dos meios de cultura ACZ, AV8, ASS, BDA e PDA.

Tabela 6 - Número de conídios dos isolados de UPF C01 e UPF C12 de *Cercospora* cf. *flagellaris*, submetidos a diferentes meios de cultura. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Meios de cultura	Número de conídios/ mL		
	Isolados		
	UPF C01	UPF C12	Média
Ágar Czapek	14.750 a A	12.950 b B	14.850
Ágar Aveia	13.600 a A	14.950 a B	13.925
Ágar Suco V8	13.250 a A	6.100 bc A	13.100
Ágar Extrato Folha de Soja	12.600 a B	14.250 a A	9.350
BDA Natural	5.450 b A	3.900 bc A	5.350
Ágar Semente de Soja	3.850 b A	5.250 bc B	3.875
PDA Sintético	1.550 c B	3.200 c A	2.375
Média	9.292	8.657	8.975

CV: Coeficiente de variação = 13,09%.

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Apesar de todos os meios de cultura demonstrarem viáveis para a produção de esporos, visualmente os meios de cultura BDA e PDA produziram micélio e conidióforos. Para trabalhos que necessitam de esporulação de *Cercospora* spp., nesse estudo observou-se que os meios de cultura AV8, ACV e AEFS são os melhores para produção de conídios. No entanto, para produzir o meio de cultura AEFS é necessário sempre ter disponível folhas de soja frescas ou pode-se realizar a secagem das folhas e obter um pó das folhas, produzindo um meio de cultura com pós de folhas de soja, que também foi capaz de produzir esporos (dados não mostrados), porém para juntar um montante de pó de folhas de soja são necessárias uma grande quantidade de folhas, tendo em vista que a produção de matéria seca por leguminosas é baixa.

O meio de cultura AV8 apesar de nesse estudo não ter apresentado IVCm e taxa de crescimento superior aos meios de cultura AAV, BDA e PDA, é um bom substrato para a esporulação e crescimento de isolados de *Cercospora* spp. Yeh e Sinclair (1980) utilizaram diferentes meios de cultura para crescimento e esporulação de *C. kikichii* e, chegaram a conclusão que o meio ágar suco - V8 foi o que melhor induziu a esporulação do fungo.

Soares (2003) obteve maiores valores de esporulação de *C. coffeicola* com os meios de cultura ágar suco - V8 e ágar extrato pó de café + V8. Os autores Brunelli et al. (2006) também obtiveram melhores valores de esporulação para *C. zae-maydis* quando cultivado em meio de cultura ágar suco V8 e meio suco de tomate temperado. O meio ágar V8 tem sido um bom substrato para induzir a esporulação de *Cercospora* spp., mas não se tem conhecimento quais substâncias presentes no meio de cultura que favorecem essa esporulação (COOPERMAN e JENKINS, 1986). Ávila e Pitelli (2004) testaram diferentes meios de cultura para crescimento micelial e esporulação de *C. piaropi* e também observaram que meios de cultura que continham extrato de tomate ou o suco V8 “Campbell” proporcionaram melhor crescimento micelial e produção de conídios.

Observou-se que a produção de conídios pelos isolados não é homogênea por toda a colônia, como ocorre na maioria de outras espécies de fungos, em *Cercospora* spp. a formação de conídios e conidióforos ocorre próximo à borda do disco de micélio

depositado no centro da placa e nas bordas da colônia. A viabilidade dos conídios foi verificada, observou-se 40% de viabilidade (dados não apresentados), quando um fungo apresenta baixa viabilidade a quantidade de esporos a ser utilizada para inoculações artificiais em plantas deve ser dobrada.

4.5 Conclusões

Os meios de cultura ágar batata dextrose – natural (BDA), ágar potato dextrose - sintético (PDA) e ágar aveia (AAV) foram os que obtiveram maiores índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e taxa de crescimento micelial para ambos os isolados de *C. cf. flagellaris*.

Para a esporulação de *C. cf. flagellaris*, os melhores meios de cultura que para ambos os isolados foram ágar czapek (ACZ), ágar aveia (AAV), ágar suco V8 “Campebell” (AV8) e ágar extrato de folha de soja (AEFS).

5 CAPÍTULO III

Sensibilidade *in vitro* de *Cercospora cf. flagellaris* à fungicidas IDM, SBI, IQe, ISDH, MBC e multissítios

5.1 Resumo

O uso de fungicidas para o controle da mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC), é uma das estratégias mais utilizadas pelos produtores de soja. Estudos recentes relataram a perda ou redução de sensibilidade de algumas espécies de *Cercospora* a fungicidas. Apesar disso, informações sobre a eficiência dos grupos químicos de fungicidas ainda são insuficientes, sendo fundamental monitorar ao longo dos anos, a alteração da sensibilidade desses fungos. O presente estudo buscou determinar a concentração efetiva (CE_{50}) de fungicidas de diferentes grupos químicos, assim como a sensibilidade dos isolados UPF C01 e UPF C12 de *Cercospora cf. flagellaris* provenientes de diferentes regiões produtoras de soja. Os fungicidas utilizados foram IDM (ciproconazol, difenoconazol, propiconazol e protriocanazol), SBI (fenpropimorfe), IQe (azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobrina e trifloxistrobina), ISDH (adepidyn, benzovindiflupir, bixafen e fluxapirroxade), MBC (carbendazim e tiofanato metílico) e multissítio (clorotalonil e mancozebe). As concentrações de fungicidas adicionadas ao meio de cultura foram: 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg. L⁻¹, sendo o tratamento controle (testemunha) 0 mg. L⁻¹. Os fungicidas IDM e SBI apresentaram os menores valores de CE_{50} (0,01 a 35,47 mg. L⁻¹), com exceção ao ciproconazol para o isolado UPF C01 (63,09 mg. L⁻¹), enquanto que ISDH e multissítio apresentaram valores intermediários a elevados (45,95 a >100 mg. L⁻¹) e, os fungicidas IQe e IST apresentaram os maiores valores (>100 mg. L⁻¹). De acordo com a classificação de sensibilidade, os isolados de *C. cf. flagellaris* são sensíveis a moderadamente sensíveis aos fungicidas IDM, exceto o isolado UPF C01 que foi insensível ao ciproconazol. Os isolados foram sensíveis ao fungicida SBI, moderadamente sensíveis a insensíveis aos ISDH e multissítio e, insensíveis aos IQe e IST. Tendo em vista os dados observados, a CE_{50} foi variável entre os grupos químicos dos fungicidas, sendo os menores valores para IDM, exceto pelo ciproconazol e, SBI, já os fungicidas ISDH e multissítio apresentaram valores intermediários e os fungicidas IQe e MBC os maiores valores. Quanto a sensibilidade dos isolados, foram sensíveis aos fungicidas IDM e SBI e, sensíveis aos fungicidas bixafen (ISDH) e mancozebe (multissítio), para os demais fungicidas dos grupos IQe, ISDH, MBC e multissítio (clorotalonil), os isolados foram insensíveis.

Palavras-chave: 1. Fungitoxicidade. 2. Crestamento foliar de *Cercospora*. 3. Mancha púrpura da semente. 4. *Cercospora spp.* 5. Concentração efetiva 50%.

5.2 Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] uma das principais commodities mundiais e de grande importância socioeconômica. Na safra 2020/2021 teve um acréscimo de 4,2 % de área plantada, correspondendo a um total de 38,5 milhões de hectares, a produção chegou a 135,9 milhões de toneladas e a produtividade foi de 3.528 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2021; EMBRAPA, 2021).

Devido a expansão da área de cultivo suplementado ao Sistema de Plantio Direto e o monocultivo da soja, a cultura pode ter seu potencial produtivo limitado durante a época de cultivo, por depender de fatores bióticos e abióticos, relacionados às condições climáticas, que favorecem o aparecimento de doenças provocadas por fungos de diversas espécies, como *Cercospora* spp. (HARTMAN, WEST e HERMAN, 2011).

A mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC), encontram-se amplamente disseminadas nas regiões produtoras de soja do Brasil, sendo a MPS a mais frequente em lotes de sementes. O agente causal relacionado à essas doenças é o fungo necrotrófico *C. kikuchii* (Matsu & Tomoyasu) Gardner, que até recentemente era tido como a única espécie associado a MPS/CFC na cultura da soja. Contudo, estudos recentes de análises filogenéticas de fungos cercosporiídeos comprovaram a existência de outras espécies associadas a MPS e CFC, sendo relatadas nos Estados Unidos, Argentina, Brasil e Bolívia as espécies *C. cf. sigesbeckiae*, *C. cf. nicotianae* e *C. cf. flagellaris*, esta última sendo a mais recorrente nas regiões produtoras de soja do Brasil (SOARES et al., 2015; ALBU et al., 2016; SAUTUA et al., 2019, 2020b).

As estratégias de manejo para MPS e do CFC incluem o controle cultural e químico, sendo que o último tem sido o mais eficiente para o controle dessas doenças. Sabe-se que o uso de cultivares resistentes é um método de controle que auxilia no manejo

de diversas doenças, porém até o momento não se tem cultivares resistentes para a MPS e o CFC, apenas um breve conhecimento de cultivares que se demonstraram tolerantes quando o complexo de doenças de *Cercospora* spp. esteve presente nos campos de produção. Os fungicidas disponíveis para o controle do CFC, geralmente são dos grupos químicos triazol (inibidores da desmetilação, IDM), estrobirulina (inibidores da Quinona externa, IQe), benzimidazol (Metil-benzimidazol-carbamato, MBC), ditiocarbamato e isoftalonitrila, sendo estes os multissítios (FRAC, 2020; GODOY et al., 2014; KIMATI et al., 2005).

O uso dos fungicidas na cultura da soja foi recomendado pela primeira vez para o controle de oídio (*Erysiphe diffusa*), após um surto epidêmico em 1996/97 e, posteriormente, das doenças de final de ciclo (DFC's) *Septoria glycines* e *C. kikuchii*, em função do monocultivo da soja e da ausência de rotação de culturas. Após o aparecimento da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) em 2001 e ausência de cultivares resistente para essa doença, houve o registro de novos produtos e novamente uma intensificação do uso dos fungicidas e, na safra 2013/14 sendo realizada em média três aplicações de fungicidas em mais de 90% das áreas de plantio no Brasil (GODOY, 2015; GODOY et al., 2007).

A aplicação de fungicidas é uma das estratégias de manejo importante para o controle dessas doenças e essencial para manter a produção econômica da soja. No entanto, apesar do efetivo controle por meio de aplicações de fungicidas, a falha no controle pode ocorrer devido à resistência dos fungos aos fungicidas. Estudos recentes relatam a perda de sensibilidade de isolados de *Cercospora* spp. aos fungicidas dos grupos químicos MBC e IQE em diversos países, incluindo os Estados Unidos (PRICE et al., 2015), Argentina (SAUTUA et al., 2020a) e recentemente no Brasil (MELLO et al., 2021). O grupo químico IQe quando aplicado isoladamente apresentam baixa eficiência de controle do complexo MPS e CFC em soja (GODOY, 2017).

Contudo, as informações sobre a eficiência dos grupos químicos de fungicidas para espécies de *Cercospora* spp. que causam a MPS e o CFC em soja ainda são insuficientes e, diante do cenário atual do cultivo da soja, torna-se essencial identificar as

espécies presentes nas áreas de cultivo, assim como, monitorar a alteração da sensibilidade de espécies de *Cercospora* aos principais grupos químicos de fungicidas utilizados em soja. Desse modo, os objetivos desse estudo foram determinar a concentração efetiva (CE₅₀) de fungicidas de diferentes grupos químicos e, determinar a sensibilidade para dois isolados de *C. cf. flagellaris* provenientes de diferentes regiões produtoras de soja.

5.3 Material e métodos

O estudo foi conduzido no laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, situada no município de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, em 2020 e 2021.

5.3.1 Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE₅₀) de fungicidas para isolados de *Cercospora cf. flagellaris*

Para a determinação da CE₅₀ foram utilizados dois isolados do fungo *C. cf. flagellaris*, codificados como UPF C01 (Itaberá - SP) e o UPF C12 (Uberlândia - MG). Os isolados foram cultivados em meio de cultura ágar suco V8 “Campbell”, em câmara de crescimento, a uma temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas por 15 dias. Placas de Petri com 9 cm de diâmetro foram utilizadas como uma unidade experimental, obtendo-se cinco repetições de cada isolado. Discos da colônia do fungo foram recortados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (4 g.L⁻¹ infusão de batata, 20 g.L⁻¹ dextrose, 15 g.L⁻¹ Ágar, pH 5,6 ± 0,2) com as respectivas concentrações dos fungicidas, sendo o controle sem adição de fungicida ao meio de cultura. Os fungicidas utilizados para esse estudo estão descritos na tabela abaixo (Tabela 7).

Tabela 7 - Fungicidas utilizados na determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE₅₀) para isolados de *C. cf. flagellaris*. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Ingrediente Ativo	Nome comercial	Concentração (g.L⁻¹)	Grupo químico	Mecanismo de Ação
Carbendazim	Carbendazim Nortox	500	Benzimidazol	IST (B1)
Tiofanato metílico	Cercobin 700 WP	700	Benzimidazol	IST (B1)
Adepidyn	-	200	Carboxamida	ISDH (C2)
Benzovindiflupir	-	100	Carboxamida	ISDH (C2)
Bixafen	-	125	Carboxamida	ISDH (C2)
Fluxapiroxade	-	300	Carboxamida	ISDH (C2)
Azoxistrobina	Priori	250	Estrobilurina	IQe (C3)
Picoxistrobina	Oranis	250	Estrobilurina	IQe (C3)
Piraclostrobina	Comet	250	Estrobilurina	IQe (C3)
Trifloxistrobina	Flint 500 WG	500	Estrobilurina	IQe (C3)
Ciproconazol	Alto 100	100	Triazol	IDM (G1)
Difenoconazol	Score	250	Triazol	IDM (G1)
Propioconazol	Tilt	250	Triazol	IDM (G1)
Protioconazol	Proline	250	Triazol	IDM (G1)
Tebuconazol	Tebufort	200	Triazol	IDM (G1)
Fenpropimorfe	Versatilis	750	Morfolina	SBI (G2)
Mancozebe	Unizeb Gold	750	Ditiocarbamatos	Multissítio (M1)
Clorotalonil	Bravonil 720	720	Isoftalonitrila	Multissítio (M5)

Nota: IDM = inibidores da desmetilação; SBI = inibidores da biossíntese de esteróis; IQe = inibidores da Quinona externa; ISDH = inibidores da síntese da Succinato Desidrogenase; MBC = inibidores da síntese da tubulina.

A metodologia para a determinação da CE₅₀ foi seguida de acordo com a descrita por Price et al. (2015) e Sautua et al. (2020a). As concentrações de fungicidas adicionadas ao meios de cultura foram: 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 mg.L⁻¹, sendo o tratamento controle

0 mg.L⁻¹. Os fungicidas foram diluídos em água destilada esterilizada e homogeneizados em meio de cultura BDA com as respectivas concentrações. Para os fungicidas IQe não foi utilizado o inibidor ácido salicílico-hidroxâmico (SHAM) da rota alternativa de respiração (AOX) pois, o SHAM se demonstrou tóxico para isolados de *C. kikuchii in vitro* e não teve efeito significativo no crescimento micelial para *C. kikuchii* e outras espécies de *Cercospora* spp. (PRICE et al., 2015; SAUTUA et al., 2020a; MELLO et al., 2021).

Após a adição dos fungicidas em suas respectivas concentrações ao meio de cultura, decorrido o período de 24 horas, foi transferido um disco da colônia de 8 mm de diâmetro dos isolados para cada placa de Petri com as respectivas concentrações dos fungicidas. Na sequência as placas foram incubadas em câmara de crescimento a uma temperatura de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas por 20 dias e procedeu-se a mensuração do crescimento micelial de cada isolado com o auxílio de um paquímetro. Não foi realizado o ensaio de esporos germinados devido a escassa esporulação do fungo em meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo nove doses de fungicidas e dois isolados do fungo (9 x 2), com cinco repetições, sendo a unidade experimental uma placa de Petri. O experimento foi executado duas vezes.

Para determinar a sensibilidade dos isolados aos fungicidas, foi utilizada a metodologia proposta por Edgington e Klew (1971), onde os fungos são altamente sensíveis aos fungicidas quando o valor da CE₅₀ for menor que 1 mg. L⁻¹; moderadamente sensíveis aos fungicidas quando o valor da CE₅₀ está entre 1 e 10 mg. L⁻¹; e os fungos são considerados insensíveis aos fungicidas quando o valor da CE₅₀ é igual ou superior a 50 mg. L⁻¹. Os dados foram submetidos à análise de regressão. A escolha do modelo mais adequada foi avaliada com base nos critérios de probabilidade de log-likelihoods e Akaike Information Criteria (AIC) e a soma do resíduo dos quadrados utilizando a função “*mselect*” do pacote “*drc*”, com o auxílio do software RStudio versão 1.2.5033 (R CORE TEAM, 2020).

5.4 Resultados e discussão

A partir dos resultados obtiveram-se os valores de concentração efetiva (CE_{50}) para cada fungicida e isolado dos experimentos (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração efetiva 50% (CE_{50}) de fungicidas *in vitro* para o crescimento micelial de isolados de *C. cf. flagellaris*. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Ingredientes Ativo	Isolados			
	UPF C01		UPF C12	
	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2
Carbendazim (B1)	> 100	> 100	> 100	> 100
Tiofanato metílico (B1)	> 100	> 100	> 100	> 100
Adepidyn (C2)	> 100	> 100	> 100	> 100
Benzovindiflupir (C2)	80,13 ± 5,29	88,41 ± 1,42	77,29 ± 4,85	> 100
Bixafen (C2)	45,95 ± 4,30	50,53 ± 1,36	43,12 ± 3,26	53,63 ± 1,51
Fluxapiroxade (C2)	> 100	> 100	> 100	> 100
Azoxistrobina (C3)	> 100	> 100	> 100	> 100
Picoxistrobina (C3)	> 100	> 100	> 100	> 100
Piraclostrobina (C3)	> 100	> 100	> 100	> 100
Trifloxistrobina (C3)	> 100	> 100	> 100	> 100
Ciproconazol (G1)	46,13 ± 11,76	63,09 ± 6,60	5,14 ± 1,31	6,09 ± 1,36
Difenoconazol (G1)	0,09 ± 0,02	0,014 ± <0,001	0,61 ± 0,10	0,59 ± 0,06
Propiconazol (G1)	0,27 ± 0,04	0,32 ± 0,02	2,94 ± 0,33	2,92 ± 0,37
Protioconazol (G1)	0,76 ± 0,09	0,22 ± 0,04	0,30 ± 0,01	1,33 ± 0,16
Tebuconazol (G1)	32,19 ± 0,47	35,47 ± 1,55	21,06 ± 0,28	25,08 ± 2,14
Fenpropimorfe (G2)	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,81 ± 0,11	0,14 ± 0,11
Clorotalonil (M1)	> 100	> 100	> 100	> 100
Mancozebe (M5)	48,02 ± 11,65	52,85 ± 4,69	41,58 ± 10,44	51,46 ± 3,02

Os fungicidas do grupo químico benzimidazol (inibidores da biossíntese da tubulina, metil-benzimidazol-carbamato, MBC), o carbendazim e o tiofanato metílico, que obtiveram valores de CE_{50} maior que 100 mg.L^{-1} , não inibindo o crescimento micelial de ambos os isolados (Figura 12).

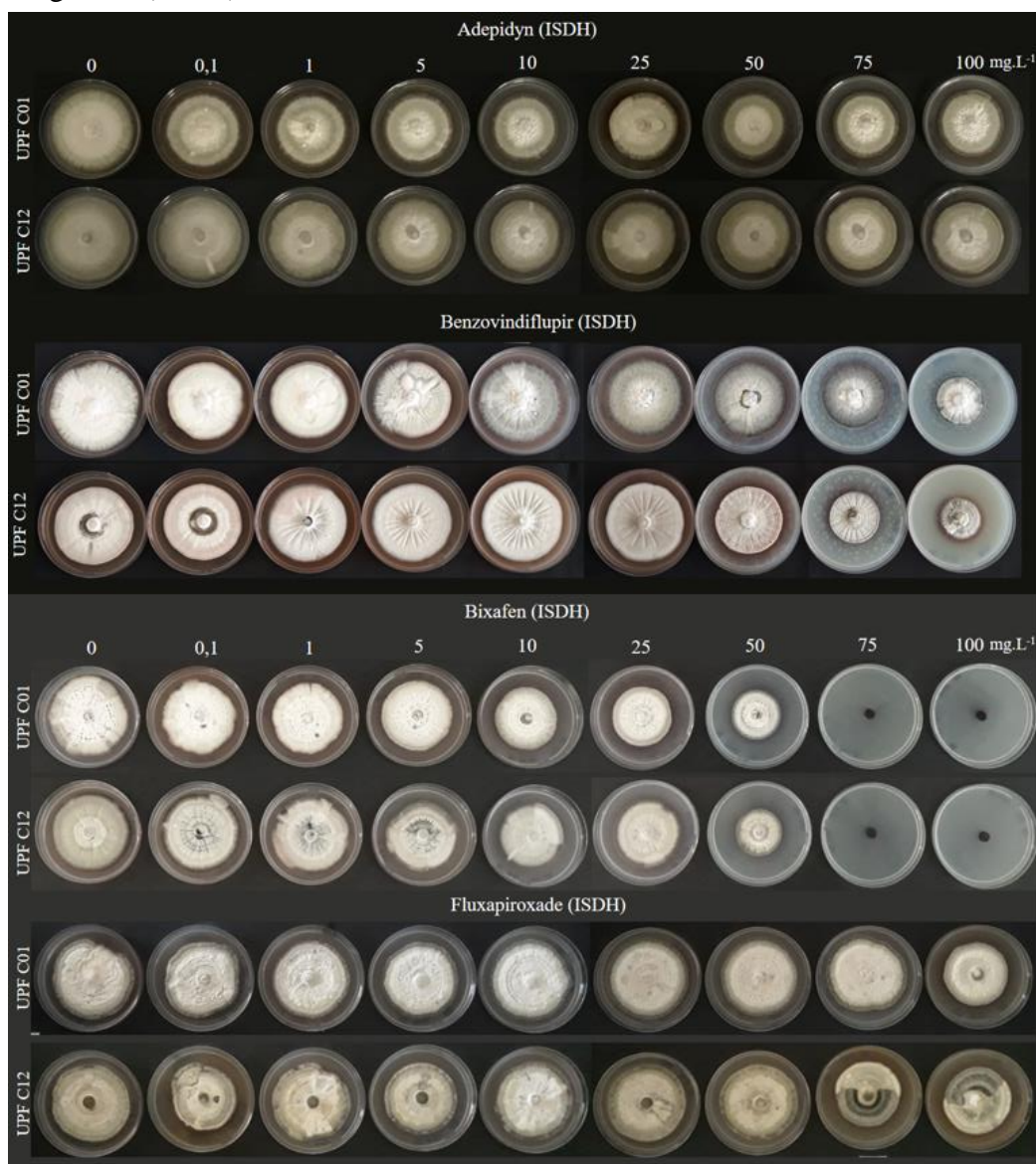
Figura 12 - Crescimento micelial de isolados (UPF C01 e UPF C12) de *Cercospora cf. flagellaris* em diferentes concentrações dos fungicidas do grupo químico benzimidazol (carbendazim e tiofanato metílico), inibidores da síntese da tubulina (MBC). FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Os fungicidas do grupo químico carboxamida (inibidores da succinato desidrogenase, ISDH) apresentaram valores de CE_{50} variável, sendo que os fungicidas adepidyn e fluxapiroxade apresentaram valores de CE_{50} maior que 100 mg.L^{-1} , não inibindo o crescimento micelial de ambos os isolados, já o fungicida benzovindupir apresentou valores de Exp1 80,13 e 77,29 mg.L^{-1} , Exp2 88,41 e $>100 \text{ mg.L}^{-1}$ para os isolados UPF C01 e UPF C12. O fungicida bixafen foi o fungicida que apresentou os menores valores de CE_{50} do grupo químico, sendo Exp1 45,95 e 43,12 mg.L^{-1} , Exp2 50,53 e 53,63 mg.L^{-1} para os isolados UPF C01 e UPF C12 (Figura 13).

Figura 13 - Crescimento micelial de isolados (UPF C01 e UPF C12) de *Cercospora* cf. *flagellaris* em diferentes concentrações dos fungicidas do grupo químico carboxamida (adepidyn, benzovindiflupir, bixafen e fluxapiróxade), inibidores da succinato desidrogenase (ISDH). FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Os fungicidas do grupo químico estrobirulina (inibidores da quinona externa, IQe), sendo azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina, apresentaram valores de CE₅₀ maior que 100 mg.L⁻¹ para ambos os isolados, tanto para o experimento 1 quanto para o 2 (Figura 14).

Figura 14 - Crescimento micelial de isolados (UPF C01 e UPF C12) de *Cercospora* cf. *flagellaris* em diferentes concentrações dos fungicidas do grupo químico estrobilurina (azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina), inibidores da síntese da Quinona externa (IQe). FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

As aplicações de fungicidas do grupo químico estrobilurina (IQe) geralmente são realizadas para o controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) e, já tem sido registrada menor eficiência dos produtos e redução da sensibilidade do fungo para

IQe, assim como para outros fungos que acometem a cultura da soja, o monitoramento da sensibilidade para alguns fitopatógenos não vem sendo relatadas devido à importância econômica da doença na soja, mas relatos na falha de controle vem sendo observados nas últimas safras (MELLO et al., 2021). Os fungicidas IQe interferem na respiração mitocondrial do fungo, afetando a germinação de esporos. De acordo com a FRAC (2020) os fungicidas IQe são considerados de alto risco para o desenvolvimento de resistência.

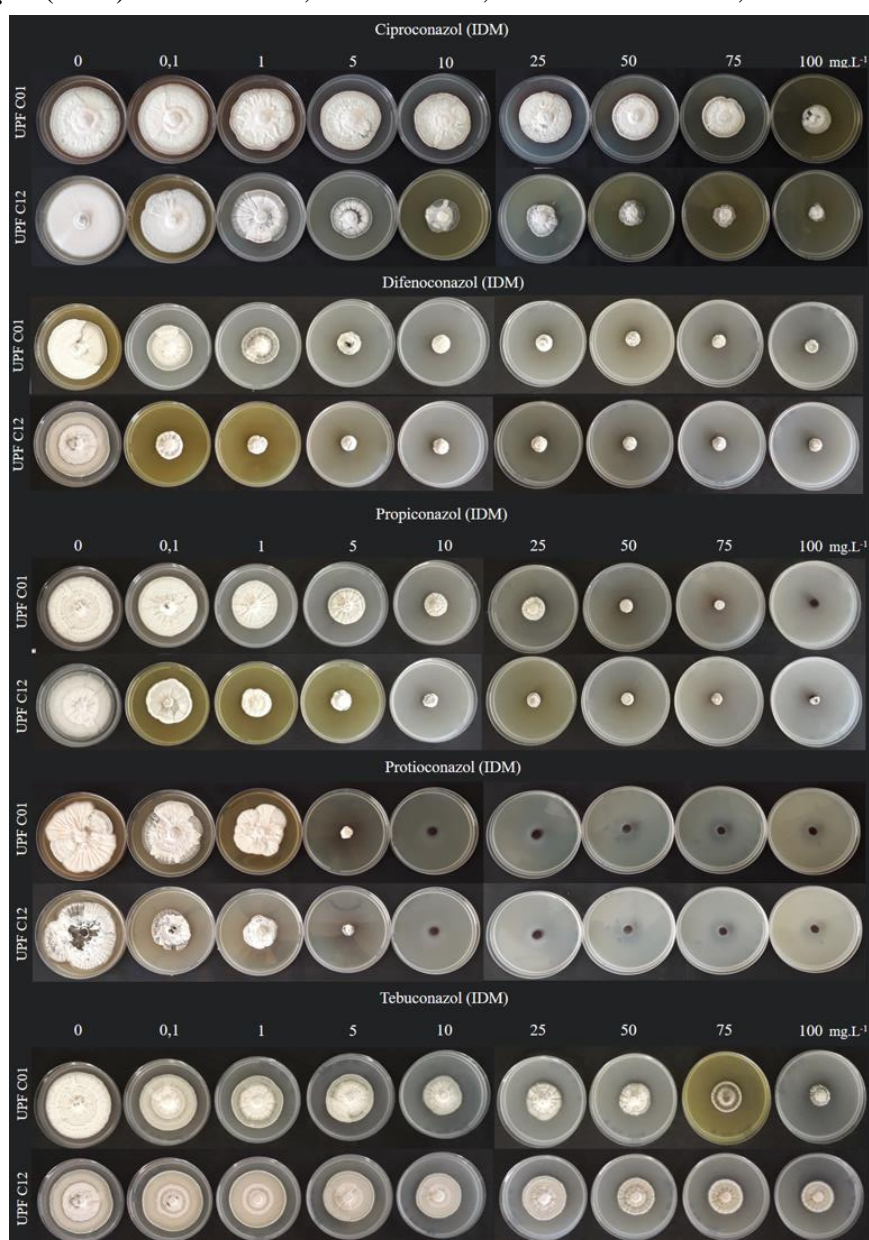
Price (2013) observou resistência aos fungicidas IQe para 83% dos isolados de *C. kikuchii*. Também encontrou resistência ao fungicida tiofanato-metílico (MBC) em isolados do fungo, cerca de 98% dos isolados avaliados foram resistentes. Detectou que isolados do fungo resistentes aos fungicidas IQe também possuíam resistência para os fungicidas MBC.

Mello et al. (2021) em seu estudo utilizou os fungicidas dos grupos químicos IQe (azoxitrobina, picoxitrobina e piraclostrobina) e MBC (metil benzimidazol carbamato) e relatou alteração da sensibilidade para isolados de *Cercospora* spp. provenientes de áreas produtoras de soja do Brasil durante a safra 2015/2016. A alteração da sensibilidade para os fungicidas IQe foi associada às mutações G143A, onde 97% dos isolados apresentaram a mutação G143A para pelo menos dois fungicidas IQe, sendo os isolados classificados como resistentes. Nesse mesmo estudo, foi relatado que a mutação E198A está relacionada com a perda da sensibilidade de isolados de *Cercospora* spp. para o grupo químico MBC (carbendazim e tiofanato metílico). Nos Estados Unidos (PRICE et al., 2015) e Argentina (SAUTUA et al., 2020a) também foram observados isolados resistentes aos IQe, sendo que isolados de *Cercospora* spp. expostos a mais de um fungicida do mesmo grupo químico apresentaram resistência cruzada.

Os fungicidas do grupo químico triazol (inibidores da desmetilação, IDM) utilizados para esse estudo apresentaram concentração efetiva (CE_{50}) variável. Com relação aos triazóis, o ciproconazol apresentou valores de Exp1 5,14 e 46,13 $mg.L^{-1}$, Exp2 6,09 e 63,09 $mg.L^{-1}$ para os isolados UPF C01 e UPF C12, o difenoconazol apresentou valores Exp1 0,09 e 0,61 $mg.L^{-1}$, Exp2 0,01 e 0,59 $mg.L^{-1}$, o propiconazol apresentou valores de Exp1 0,27 e 2,94 $mg.L^{-1}$, Exp2 0,32 e 2,92 $mg.L^{-1}$, o protioconazol de Exp1

0,76 e 0,30 mg.L⁻¹, Exp2 0,22 e 1,33 mg.L⁻¹, o tebuconazol de Exp1 32,19 e 21,06 mg.L⁻¹, Exp2 35,47 e 25,08 mg.L⁻¹ (Figura 15). O fungicida fenpropimorfe, do grupo químico morfolina (SBI II), apresentou valores de Exp1 0,07 e 0,81 mg.L⁻¹, Exp2 0,81 e 0,14 mg.L⁻¹ para os isolados UPF C01 e UPF C12 (Figura 16).

Figura 15 - Crescimento micelial de isolados (UPF C01 e UPF C12) de *Cercospora cf. flagellaris* em diferentes concentrações dos fungicidas do grupo químico triazol (ciproconazol, difenoconazol, propiconazol, protioconazol e tebuconazol), inibidores da desmetilação (IDM). FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Figura 16 - Crescimento micelial de isolados (UPF C01 e UPF C12) de *Cercospora* cf. *flagellaris* em diferentes concentrações do fungicida do grupo químico morfolina (fenpropimorfe), inibidor da biossíntese de esteróis (SBI: Classe II). FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande Do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Price (2013) avaliou a CE_{50} de isolados de *C. kikuchii* expostos aos fungicidas flutriafol, tetraconazol e propiconazol (IDM), encontrando diferenças significativas para uma menor sensibilidade dos isolados e, sensibilidade cruzada para esses fungicidas. Indicando que mudanças na sensibilidade do fungo estão sendo encontradas para os fungicidas IDM, assim o monitoramento para espécies de *Cercospora* deve ser realizado para esse grupo químico.

Os fungicidas multissítios apresentaram valores de CE_{50} maiores que 100 mg.L^{-1} para o clorotalonil (isoflazonitrila) ambos os isolados, não inibindo o crescimento micelial. Já o fungicida mancozebe (ditiocarbamato) apresentou valores de Exp1 48,02 e $41,58 \text{ mg.L}^{-1}$, Exp2 41,58 e $51,46 \text{ mg.L}^{-1}$ para os isolados UPF C01 e UPF C12 (Figura 17).

Os multissítios interferem em diversos processos da célula dos fungos e desse modo, possuem um amplo espectro no controle das doenças, esses fungicidas afetam diversas rotas metabólicas vitais dos fungos (BALARDIN et al., 2017; FRAC, 2020; REIS, REIS e CARMONA, 2019; RODRIGUES, 2006). Os multissítios possuem modo de ação protetor ou preventivo, desse modo, após a deposição do fungo sobre seu hospedeiro tratado com fungicida multissítio, o fungicida irá agir durante a germinação

do esporo (REIS, REIS e CARMONA, 2019). Desse modo, os valores de CE_{50} elevados para o clorotalonil e mancozebe podem estar relacionados ao fato da baixa esporulação de *Cercospora* em meios de cultura, além disso, a eficácia dos fungicidas pode ser variável quando são testados *in vitro* e *in vivo* pois, observa-se que os multissítios são eficientes no controle de manchas foliares quando aplicados em campo. Os fungicidas multissítio apresentam diferenças quando utilizados *in vitro* e em campo, para o controle de *Cercospora* spp., pode ser que esteja relacionado ao modo de ação protetor desses fungicidas, que fazem com que demonstrem diferença no controle do fungo.

Figura 17 - Crescimento micelial de isolados (UPF C01 e UPF C12) de *Cercospora* cf. *flagellaris* em diferentes concentrações dos fungicidas multissítios clorotalonil (Isoftalonitrila) e mancozebe (Ditiocarbamato). FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Fonte: Silva, M. A., 2020.

Propondo a classificação de Edgington et al. (1971), que diz que para que um fungo seja considerado altamente sensível aos fungicidas, devem apresentar $CE_{50} < 1$ $mg.L^{-1}$, quando apresentam CE_{50} entre 1 e 10 $mg.L^{-1}$ os fungos são considerados moderadamente sensíveis e, quando apresentam CE_{50} igual ou > 50 $mg.L^{-1}$ são considerados insensíveis aos fungicidas.

Os isolados foram insensíveis para os fungicidas do grupo químico estrobirulina (IQe), carboxamida (ISDH) e benzimidazol (MBC). O fungicida bixafen (carboxamida, ISDH) foi o único em que os isolados foram moderadamente sensíveis. Já para os fungicidas multissítios, os isolados foram moderadamente sensíveis ao mancozebe e insensíveis ao clorotalonil.

O grupo químico ISDH é muito utilizado para o controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), antracnose (*Colletotrichum truncatum*) e mancha alva (*Corynespora cassicola*) e, as aplicações recorrentes tem intensificado a seleção de isolados menos sensíveis às moléculas (GODOY, 2019; MELLO, 2019). Para espécies de *Cercospora* há poucas informações quanto ao uso de ISDH para determinar a CE₅₀ e sensibilidade de isolados, esse estudo comprova a alteração de sensibilidade do fungo, portando, deve-se realizar mais estudos quanto a eficiência do grupo químico ISDH à isolados de espécies de *Cercospora* spp. que causam a MPS e o CFC em soja.

Os isolados de *C. cf. flagellaris* foram altamente sensíveis ao grupo químico triazol, no entanto, o isolado UPF C01 foi insensível e o isolado UPF C12 foi moderadamente sensível ao fungicida ciproconazol. Para o fungicida tebuconazol os isolados foram moderadamente sensíveis e, o isolado UPF C12 foi moderadamente sensível ao fungicida propiconazol. Para o fungicida fenpropimorfe (grupo químico morfolina, SBI) os isolados foram altamente sensíveis.

Price et al. (2015) observou alteração na sensibilidade de *C. kikuchii* para o grupo químico IDM (flutriafol, propiconazol e tetraconazol), em *C. beticola* foi confirmada resistência aos IDM. Contudo, a maioria das espécies de *Cercospora* spp. demonstram-se sensíveis aos IDM, mas ainda são poucas as informações quanto a sensibilidade dos IDM para outras espécies de *Cercospora* spp., assim há necessidade de monitorar as populações do fungo quanto a alteração de sensibilidade aos fungicidas do grupo químico IDM.

A ocorrência da variação da CE₅₀, ou seja, a quantidade de fungicida em mg.L⁻¹ que controla 50% da germinação do esporo ou do crescimento micelial do fungo,

apresentou-se variada entre os grupos químicos avaliados nesse estudo para ambos os isolados de *C. cf. flagellaris*. Essa variação está relacionada com a adaptabilidade do fitopatógeno aos fungicidas, além da diversidade dentro das populações do fitopatógeno quanto sua agressividade (genética e fisiologia do fungo), que por consequência, resulta na diminuição da performance dos fungicidas e seleção de organismos resistentes. Arelado a isso, ainda pode-se dizer que o intenso uso repetitivo de alguns fungicidas com mesmos mecanismos de ação, pode ter levado a redução da eficiência dentro dos grupos químicos, eliminando populações de indivíduos sensíveis e selecionando populações de fitopatógenos insensíveis, ou seja, resistentes às moléculas dos fungicidas.

Mello et al. (2021) sugere que as alterações de sensibilidade de *Cercospora* spp. e perda de eficiência dos fungicidas vem ocorrendo desde a safra 2008 no Brasil. Este fato causa grande preocupação, visto que estudos confirmam que pode haver resistência cruzada, ou seja, fungos resistentes a um fungicida também são resistentes aos demais produtos que possuem o mesmo mecanismo de ação.

O monitoramento constante da eficiência dos fungicidas para diferentes fitopatógenos em soja, torna-se vital para identificar variabilidade na população e assim, prever possível alteração na sensibilidade aos fungicidas, com possibilidade de adotar medidas que reduzam o impacto no controle das doenças. A utilização de estratégias anti-resistência como aplicação preventiva de fungicidas, melhoria na tecnologia de aplicação, alternância de fungicidas de diferentes grupos químicos, associação de fungicidas sistêmicos (triazol, estrobilurina, carboxamida) com fungicidas multissítios (ditiocarbamato, isoftalonitrila e cobre), tornam-se fundamentais para manter o controle eficiente.

5.5 Conclusões

A concentração efetiva (CE_{50}) foi variável entre os grupos químicos de fungicidas para os isolados de *C. cf. flagellaris*, sendo os fungicidas IDM com os menores valores de CE_{50} para o crescimento micelial, com exceção dos fungicidas ciproconazol para o

isolado UPF C01 e tebuconazol para ambos os isolados. Os fungicidas ISDH e multissítio apresentaram valores intermediários de CE_{50} e enquanto os fungicidas IQe e MBC tiveram os maiores valores de CE_{50} .

Os isolados de *C. cf. flagellaris* utilizados nesse estudo foram sensíveis aos fungicidas IDM, exceto o isolado UPF C01 que foi insensível ao fungicida ciproconazol. Enquanto que se apresentaram insensíveis aos fungicidas IQe e ISDH e MBC. Os isolados de *C. cf. flagellaris* foram sensíveis ao fungicida bixafen (carboxamida, ISDH). Dos fungicidas multissítio, os isolados foram insensíveis ao clorotalonil e moderadamente sensíveis para o mancozebe.

6 CAPÍTULO IV

Reação de cultivares brasileiras de soja à *Cercospora* cf. *flagellaris*, agente causal da mancha púrpura da semente (MPS) e do crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) em soja

6.1 Resumo

A resistência genética, associada ao controle químico e cultural é uma das estratégias que o produtor pode utilizar para o controle da mancha púrpura da semente (MPS) e do crestamento foliar de *Cercospora* (CFC). Apesar disso, genes de resistência ainda não foram identificados e não há registro de cultivares resistentes para a MPS e o CFC no Brasil, apenas há o conhecimento de cultivares de soja tolerantes a essas doenças em ensaios de campo. Desse modo, o objetivo desse estudo foi determinar a reação de cultivares de soja a dois isolados UPF C01 e UPF C12 de *C. cf. flagellaris*. Cultivares de soja foram inoculadas artificialmente em estágio V4 por meio de aspersão da suspensão de conídios e micélio do fungo. Constatado os sintomas característicos de crestamento foliar de *Cercospora* realizou-se avaliação de severidade nos trifólios aos 21 dias após a inoculação. A severidade do crestamento foliar de *Cercospora* foi baixa para a maioria dos cultivares avaliados. As cultivares de soja M8372 IPRO, NS6010 IPRO FD60, M5917 IPRO e M5947 IPRO, não apresentaram sintomas de CFC quando inoculadas com o isolado UPF C12. A maior severidade foi observada nas cultivares TMG7262 (2,67%), BRS6203 (2,63%) e BRS5601 (1,75%) para o isolado UPF C01. Já para o isolado UPF C12 a cultivar com maior severidade foi a PIONEER 95R51 (1,83%). Desse modo, o isolado UPF C01 foi mais agressivo que o UPF C12, mesmo ambos sendo da mesma espécie. Não foi observado sintomas do crestamento foliar de *Cercospora* nas cultivares M8372, NS6010, M5917 e M5947 inoculadas com o isolado UPF C12. A severidade foi maior para as cultivares TMG7262, BRS6203 e BRS5601, inoculadas com o isolado UPF C01, enquanto, para o isolado UPF C12 a maior severidade foi no cultivar PIONEER 95R51.

Palavras-chave: 1. *Cercospora* spp.. 2. Crestamento foliar de *Cercospora*. 3. Severidade. 4. Cultivares de soja. 5. *Glycine max* L.

6.2 Introdução

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill) pode vir a ter seu potencial produtivo reduzido devido ao monocultivo da cultura, associado ao sistema de plantio direto e às condições ambientais favoráveis, que fornecem um ambiente propício ao aparecimento de doenças causadas pela presença de diversas espécies de fitopatógenos. Entre eles os fungos necrotróficos que sobrevivem nos restos culturais e em sementes e, geralmente estão associados às doenças de final de ciclo (DFC's), a mancha púrpura da semente (MPS) e o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC), têm como agente causal o fungo *C. kikuchii*. Contudo, pesquisas recentes demonstraram que diferentes espécies do gênero *Cercospora* estão associadas a MPS e ao CFC, sendo mais recorrentes nas áreas de cultivo as espécies *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. cf. nicotianae* (ALBU et al., 2016; SAUTUA et al., 2019; SOARES et al., 2015).

A MPS e o CFC possuem maior ocorrência em regiões quentes, úmidas e chuvosas, como no Cerrado brasileiro. Os sintomas dessas doenças geralmente são observados nos estádios reprodutivos da cultura, o CFC apresenta pontuações escuras, de coloração castanho-avermelhadas de formato irregular, que coalescem com a evolução da doença para manchas escuras, apresentando como característica o crestamento e desolha prematura. Nas sementes, o sintoma observado é a pigmentação púrpura do tegumento da semente, sendo este o sintoma característico da doença. Além disso, os sintomas também podem ser observados nas hastes e vagens, onde observa-se manchas vermelhas irregulares nas hastes e, nas vagens ocorrem manchas punctiformes de coloração vermelha (KIMATI et al., 2005; KLINGELFUSS; YORINORI, 2001; KUDO; BLUM, 2011; SOARES et al., 2015).

A evolução e severidade das doenças MPS e CFC, está relacionada com a capacidade de espécies de *Cercospora* produzirem uma toxina não-específica chamada cercosporina, a qual está diretamente relacionada com a patogênese e a agressividade do fitopatógeno. Essa toxina é um composto fotoativo, que ao absorver energia luminosa

passa a produzir espécies reativas de oxigênio (ERO's) que causam a ruptura das membranas pela peroxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando morte celular (DAUB e EHRENSHAFT, 2000; UPCHURCH et al., 1991). Além da produção de cercosporina, as condições ambientais favoráveis também são fatores que desenvolvem e intensificam os sintomas da MPS e do CFC pelo fitopatógeno, temperaturas entre 15 a 30°C, alta umidade e de molhamento foliar de pelo menos 18 horas, proporcionam maior severidade dos sintomas na planta. A intensificação dos sintomas do CFC é observada quando a temperatura está entre 20 e 24°C e a umidade relativa é acima de 80%. Além disso, há uma maior liberação de esporos do fungo, que indicam relação com a severidade da doença (GODOY et al., 2007; KUDO; BLUM; LIMA, 2011; SCHUH, 1991).

O manejo da MPS e do CFC incluem o controle cultural e químico, sendo que último tem sido o mais eficiente para o controle dessas doenças. O controle genético é o método mais eficiente e econômico para o controle diversas doenças na cultura da soja. Entretanto, para a MPS e o CFC, os programas de melhoramento genético ainda não identificaram genes de resistência para essas doenças ocasionadas por *Cercospora*. Tal impasse se deve a variabilidade genética da população do fitopatógeno, que dificulta a busca por fontes de resistências nas plantas. E, diante das descobertas e ocorrência de outras espécies de *Cercospora* estarem associadas a MPS e ao CFC, traz implicações no controle das doenças e a falta de informações sobre a reação de genótipos de soja dificulta o trabalho dos melhoristas em obter cultivares com resistência a longo prazo (ALMEIDA et al., 2005; BORGES, 2016; GODOY et al., 2014; KIMATI et al., 2005; KUDO; BLUM, 2011).

Desse modo, o objetivo desse estudo foi determinar a reação de cultivares de soja ao crestamento foliar de *Cercospora* causado por *C. cf. flagellaris*.

6.3 Material e métodos

O estudo foi conduzido na Universidade de Passo Fundo (UPF), no Laboratório de Fitopatologia e em câmara de crescimento, da Faculdade de Agronomia e Medicina

Veterinária (FAMV), situada no município de Passo Fundo, Rio Grande Do Sul, Brasil, em 2020 e 2021.

6.3.1 Multiplicação dos isolados e preparo do inóculo para inoculação

Foram utilizados dois isolados do fungo *C. cf. flagellaris*, sendo identificados como UPF C01 (Itabéra – SP) e UPF C12 (Uberlândia – MG). A multiplicação da colônia do fungo de cada isolado foi realizada com o auxílio de agulha histológica esterilizada, sendo transferido um disco de micélio de 8 mm para placas de Petri contendo meio nutritivo ágar suco V8 “Campbell”. Após a repicagem as placas foram vedadas com filme plástico de parafina (Parafilm®) e acondicionadas em câmara de crescimento, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por 15 dias.

Decorrido o período de crescimento das colônias do fungo procedeu-se a remoção das estruturas fúngicas (micélio e esporos) a partir da raspagem superficial das colônias com auxílio de um pincel chato n° 20 e água destilada. Desta suspensão, com auxílio de micropipetador foi transferido 0,01 mL para uma lâmina microscópica, coberta com lamínula e realizada a contagem de conídios. Posteriormente, preparou-se uma suspensão com 50.000 conídios/mL e água destilada, foi adicionada uma gota de espalhante adesivo Tween 20 para melhorar a distribuição do inóculo sobre as folhas de soja.

6.3.2 Inoculação de *Cercospora cf. flagellaris* em cultivares de soja

Para verificar a reação de plantas de soja, foram selecionadas 30 cultivares de soja (Tabela 9), a escolha das cultivares de soja foi realizada com base nas mais cultivadas no Brasil.

Tabela 9 - Cultivares de soja (*Glycine max* L.) utilizadas para inoculação artificial de *C. cf. flagellaris*, para determinação da reação. FAMV/UPF, Passo Fundo, 2022.

Cultivares de soja	Obtentor
BMX Alvo RR	Brasmax Genética
BMX Ativa RR	Brasmax Genética
BMX Delta IPRO	Brasmax Genética
BMX Lança IPRO	Brasmax Genética
BMX Raio IPRO	Brasmax Genética
BMX Veloz RR	Brasmax Genética
BMX Zeus IPRO	Brasmax Genética
BRS5601 RR	Embrapa
BRS6203 RR	Embrapa
DM 57i52 IPRO	DonMario Sementes
DM 5958 IPRO	DonMario Sementes
DM 61i59 IPRO	DonMario Sementes
DM 66i68 IPRO	DonMario Sementes
FPS 1859 RR	Geneze Sementes S.A
M 5892 IPRO	Monsoy LTDA
M 5917 IPRO	Monsoy LTDA
M 5947 IPRO	Monsoy LTDA
M 6210 IPRO	Monsoy LTDA
M 6410 IPRO	Monsoy LTDA
M 7198 IPRO	Monsoy LTDA
M 8372 IPRO	Monsoy LTDA
NS 5700 IPRO FD60	Nidera Sementes LTDA
NS 5959 IPRO	Nidera Sementes LTDA
NS 6010 IPRO FD60	Nidera Sementes LTDA
PIONEER 95R51	Pioneer Sementes
PIONEER 95Y72	Pioneer Sementes
TMG 7061 IPRO	Tropical Melhoramento Genético LTDA
TMG 7063 IPRO	Tropical Melhoramento Genético LTDA
TMG 7260 IPRO	Tropical Melhoramento Genético LTDA
TMG 7262 RR	Tropical Melhoramento Genético LTDA

Ao todo foram semeadas quatro sementes em copos plásticos com capacidade de 500 mL, contendo uma mistura de solo e substrato (1:1). Após a emergência das plantas realizou-se o desbaste, mantendo-se duas plântulas por recipiente. As plantas foram

cultivadas em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V3-V4 foi realizada a aspersão da suspensão de inóculo de cada isolado sobre os folíolos de soja até o ponto de escorrimento. O tratamento controle (testemunha) recebeu apenas a pulverização de água destilada e Tween 20. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, composto por 30 cultivares de soja e dois isolados do fungo *C. cf. flagellaris* (30 x 2), com quatro repetições.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento e colocadas em câmara úmida por um período de 48 horas, utilizando sacos plásticos transparentes. Decorrido o tempo de câmara úmida, retirou-se os sacos plásticos das plantas e as mesmas foram transferidas para câmaras contendo irrigação por aspersão. As plantas, receberam molhamento foliar durante 1 minuto com intervalos de 8 horas, permanecendo por um período de 18 horas de molhamento foliar, para manter as condições de umidade para o desenvolvimento da doença. As plantas inoculadas com os isolados foram mantidas a uma distância de 0,7 m para evitar a contaminação entre os tratamentos. Posteriormente, realizou-se a observação diária das plantas até a presença ou ausência dos sintomas. As avaliações foram realizadas após 21 dias da inoculação, sendo observada a presença e severidade (porcentagem da área foliar afetada) dos sintomas da doença nos trifólios de soja, utilizando a escala diagramática proposta por James (1971; *Stemohylium* leaf spot of red clover, número 24) (Anexo I).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a transformação angular ($\arcsen\sqrt{x/100}$) foi aplicada, as médias foram comparadas pelo Teste de Student-Newman-Keuls (SNK) a 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$). Para as análises estatísticas utilizou-se o software RStudio versão 1.2.5033 (RCORE TEAM, 2020).

6.4 Resultados e discussão

Os sintomas iniciais do crestamento foliar de *Cercospora* iniciaram entre 6 e 10 dias após a inoculação. As plantas utilizadas como testemunhas, pulverizadas apenas com água destilada e Tween 20 não apresentaram sintomas da doença. As avaliações de severidade se iniciaram após 14 dias da inoculação, porém a apresentação dos dados de severidade nesse estudo foi aos 21 dias após a inoculação pois, não foi observada a evolução dos sintomas de crestamento foliar de *Cercospora* nas cultivares de soja, mantendo-se as mesmas notas desde o início das avaliações (Tabela 10; Figura 18). A severidade variou entre as cultivares de soja e os isolados.

Os sintomas se iniciaram nas primeiras folhas cotiledonares (unifolioladas), sendo mais severos os sintomas de CFC. Nos trifólios foram observadas pequenas lesões de coloração castanho-avermelhadas, manchas irregulares que se iniciaram da borda para o centro das folhas de coloração castanho-avermelhadas, foi observada a coloração arroxeadada ou púrpura em alguns trifólios das cultivares, sendo a maior predominância nas folhas cotiledonares, em alguns folíolos foi possível observar início de clorose. A cultivar BMX Delta IPRO e BMX Alvo RR apresentaram início de clorose no terceiro trifólio (ápice). A cultivar DM 61i59 IPRO se observou início de crestamento. Nas cultivares M 6210 IPRO e NS 5700 IPRO FD60 observou-se um halo amarelado em volta das pequenas lesões de coloração castanho-avermelhada.

Tabela 10 - Severidade (%) de cultivares de soja ao crestamento foliar de *Cercospora*, para dois isolados de *C. cf. flagellaris*, isolados UPF C01 e UPF C12. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.

Cultivares	Isolados de <i>Cercospora cf. flagellaris</i>		Média
	UPF C01	UPF C12	
	Severidade %		
TMG7262 RR	2,67 a A	1,08 abc B	1,88
BRS6203 RR	2,63 a A	0,21 bc B	1,42
BRS5601 RR	1,75 ab A	1,29 ab A	1,52
M8372 IPRO	1,56 abc A	0 c B	0,78
BMX Veloz RR	1,50 abc A	0,75 abc B	1,13
BMX Delta IPRO	1,33 abc A	0,17 bc B	0,75
DM61i59 IPRO	1,42 abc A	1,54 ab A	1,48
BMX Lança IPRO	1,33 abcd A	0,67 abc A	1,00
FPS1859 RR	1,25 abcd A	0,50 abc B	0,88
DM5958 IPRO	1,29 abcd A	0,71 abc A	1,00
BMX Raio IPRO	1,42 abcd A	0,25 abc B	0,83
PIONEER 95R51	0,98 abcde A	1,83 a A	1,41
DM57i52 IPRO	0,96 abcde A	0,88 abc A	0,92
BMX Alvo RR	0,83 abcde A	0,04 c B	0,44
TMG7063 IPRO	0,85 abcde A	0,75 abc A	0,80
TMG7061 IPRO	0,85 abcde A	0,08 c B	0,47
M7198 IPRO	0,77 abcde A	0,58 abc A	0,68
NS6010 IPRO FD60	0,71 abcde A	0 c B	0,35
M5917 IPRO	0,63 bcde A	0 c B	0,31
NS5700 IPRO FD60	0,58 bcde A	0,58 abc A	0,58
TMG7260 IPRO	0,46 bcde A	0,13 bc A	0,29
BMX Zeus IPRO	0,42 bcde A	0,50 abc A	0,46
DM66i68 IPRO	0,42 bcde A	0,42 abc A	0,42
M6410 IPRO	0,35 bcde A	0,42 abc A	0,39
M5947 IPRO	0,33 bcde A	0 c B	0,17
NS5959 IPRO	0,33 bcde A	0,29 abc A	0,31
PIONEER 95Y72	0,29 bcde A	0,17 bc A	0,23
BMX Ativa RR	0,23 cde A	0,75 abc A	0,49
M5892 IPRO	0,13 de A	0,54 abc A	0,33
M6210 IPRO	0,10 e A	0,67 abc B	0,39
Média	0,95	0,53	0,74

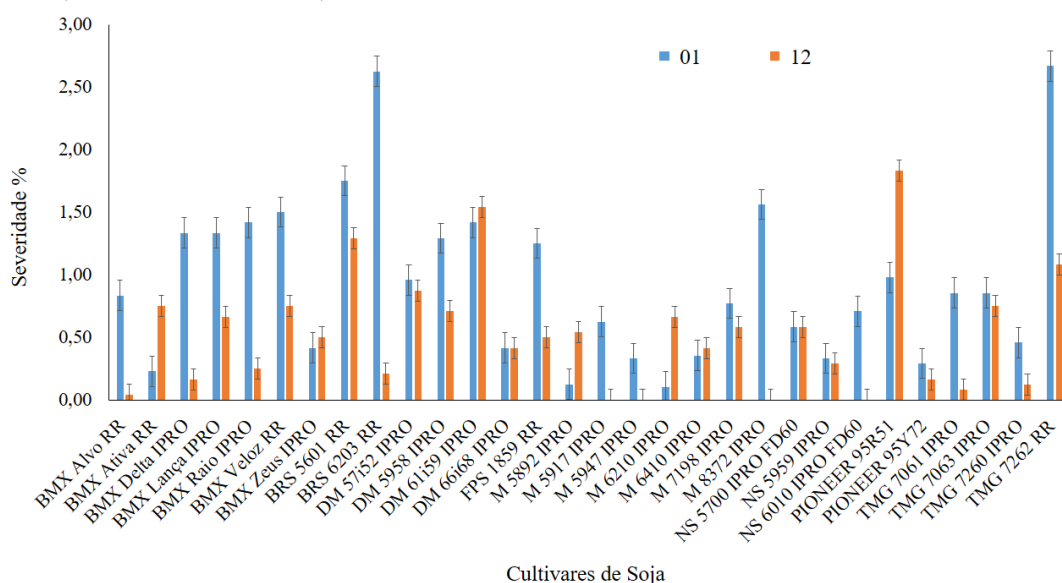
CV (%): 48,12

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Student-Newman-Keuls SNK a 5% de probabilidade de erro.

O isolado UPF C01 apresentou os maiores valores de severidade em comparação com o isolado UPF C12. A agressividade do isolado segundo Almeida et al. (2005) está relacionada com a quantidade de cercosporina produzida pelo fungo, nesse caso, os resultados obtidos do Capítulo I, o isolado UPF C01 teve maior concentração de cercosporina em relação ao isolado UPF C12, outro fator que também pode ser levado em consideração é a viabilidade dos esporos do fungo que podem interferir na expressão e evolução dos sintomas da doença.

A severidade variou entre as cultivares de soja (Figura 17), mas estatisticamente não houve diferença entre a maioria das cultivares (Tabela 11). Para o isolado UPF C01 as cultivares que tiveram maiores valores de severidade foram TMG7262 RR, BRS6203 RR e BRS5601 RR, diferindo estatisticamente das cultivares BMX Ativa RR, M5892 IPRO e M6210 IPRO, que tiveram os menores valores de severidade.

Figura 18 - Severidade (%) do cretamento foliar de *Cercospora* de *C. cf. flagellaris*, isolados UPF C01 e UPF C12, em diferentes cultivares de soja. FAMV/UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022.



Para o isolado UPF C12 a cultivar que obteve maior severidade foi a PIONEER 95R51, diferindo do grupo de cultivares BRS6203 RR, BMX Delta IPRO, PIONEER 95Y72, TMG7260 IPRO, TMG7061 IPRO, BMX Alvo RR, M5917 IPRO, M5947 IPRO, M8372 IPRO e NS6010 IPRO FD60 que tiveram menor severidade dos sintomas de CFC.

As cultivares BRS5601 RR e DM61i59 IPRO diferiram estatisticamente das cultivares TMG7061 IPRO, BMX Alvo RR, M5917 IPRO, M5947 IPRO, M8372 IPRO e NS6010 IPRO FD60. As cultivares que não apresentaram sintomas de CFC foram M8372 IPRO, NS6010 IPRO FD60, M5917 IPRO e M5947 IPRO, apenas para o isolado UPF C12. Geralmente, cultivares que apresentam halo de coloração amarelada circundando a lesão provocada por um fitopatógeno, podem apresentar certa tolerância ou resistência.

Almeida et al. (2005), em seu trabalho diz que no Brasil, ainda não foram identificados genes de resistência para a mancha púrpura da semente e o crestamento foliar de *Cercospora*, permanecendo o mesmo cenário até o presente momento. Genes de resistência tem sido identificado em genótipos e linhagens de soja nos EUA, sendo relatado Alloatti et al. (2015), onde utilizaram marcadores genéticos na linhagem PI 80837 para a MPS, evidenciando resistência à doença e sendo esta, controlada por apenas um gene dominante. Segundo Orth e Schuh (1994) foram encontrados variáveis níveis de resistência à MPS e ao CFC em cultivare de soja, mas não há correlação entre a incidência da MPS e do CFC, sendo as doenças dependentes das condições ambientais.

Até o momento poucos estudos foram realizados com inoculação de *Cercospora* em plantas de soja e em diversificado número de cultivares de soja, Cai e Schneider (2009) realizaram inoculações em 11 cultivares de soja, encontrando apenas duas com nível moderado de resistência ao CFC, sendo as cultivares Asgrow (AG5701) e Terral (TV59R85). A maioria dos trabalhos que envolvem o CFC é a nível de campo e, ainda sim os níveis da doença se apresentaram baixos. Além disso, o fungo possui crescimento lento e baixa esporulação quando cultivado em meio de cultura, mesmo cultivado em condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento. Esses fatores dificultam o desenvolvimento de trabalhos que podem vir a auxiliar os programas de melhoramento na obtenção de cultivares resistentes ao crestamento foliar de *Cercospora*.

Kudo (2009) avaliou a severidade a campo de diferentes genótipos de soja ao CFC, também relatou baixa severidade entre os materiais avaliados, classificou os genótipos de soja como resistentes ao CFC pois, nenhum genótipo teve a média de severidade maior que 1%. Os autores ainda citam que, trabalhos envolvendo *Cercospora kikuchii* tem sido

concentrado na avaliação da infecção das vagens ou da folha no final do ciclo da cultura. Alloatti et al. (2015) avaliaram a reação de diferentes genótipos de soja em campo com inoculação natural e artificial e, encontraram genótipos resistentes a mancha púrpura da semente e ao crestamento foliar de *Cercospora*. A inoculação artificial foi útil para avaliar a incidência da MPS, no entanto para o CFC não. Contudo, os autores dizem que a inoculação artificial pode ser útil para avaliar a incidência e severidade da doença quando as condições do campo não são favoráveis para o desenvolvimento do fitopatógeno. Observaram também que a alta incidência de CFC não representa a alta incidência da MPS pois, um dos genótipos carregavam um gene de resistência para a MPS e apresentou alta incidência de CFC. Os autores Alloatti et al. (2015) ainda sugerem que, a resistência de genótipos de soja pode estar associada por genes maiores e menores e, que existe resistência vertical para os valores de reposta extremamente baixos ou altos e resistência horizontal para valores intermediários em relação a MPS e a infecção por *C. kikuchii*.

Os valores de severidade para esse estudo foram baixos, e como dito antes não houve evolução dos sintomas do CFC nas cultivares de soja. Diversos fatores podem ter contribuído para a não evolução dos sintomas, podendo estar relacionados com os isolados de *Cercospora*, fatores ambientais e a própria reação das cultivares de soja, que nesse caso são desconhecidas. O fator isolado, pode estar relacionado com a viabilidade dos esporos, já que o fungo possui baixa esporulação quando cultivado em meio de cultura. Alloatti et al. (2015) utilizaram uma suspensão de esporos de 80 mil conídios/mL e 135 mil conídios/mL, e observaram que isolados que permaneceram armazenado por um ano a multiplicação e esporulação foi difícil de se obter, que poderia ter contribuído para baixas taxas de infecção por *C. kikuchii*. Para esse estudo foram utilizados 50 mil conídios/mL na suspensão.

Além disso, *Cercospora* possui um período de latência, ou seja, pode estar infectando o hospedeiro, mas não manifesta sintomas nos estádios iniciais da cultura, sendo mais visível o CFC os estádios reprodutivos da soja. (KLINGELFUSS; YORINORI, 2001). Quanto ao fator ambiental, por mais que as plantas inoculadas estivessem sob temperatura e molhamento foliar controlados, em algum momento pode ter ocorrido a falta de um desses fatores, que possivelmente pode estar mais relacionado

com o molhamento foliar, tendo em vista que *Cercospora* necessita de no mínimo 18 horas de molhamento foliar (GODOY et al., 2007; SCHUH, 1991). Orth & Schuh (1994) realizaram a avaliação de 17 cultivares de soja, identificando uma cultivar resistente ao CFC tanto para o experimento desenvolvido em câmara de crescimento quanto para o experimento desenvolvido a campo. A inoculação em câmara de crescimento foi realizada no estágio vegetativo V3 das cultivares. No entanto, os sintomas foram observados somente no estágio reprodutivo R6, demonstrando que o fungo está envolvido em infecções latentes.

Desse modo, foi possível observar a reação de diferentes cultivares de soja, mesmo sendo obtidos baixos valores de severidade, algumas cultivares de soja se demonstraram serem mais suscetíveis aos CFC, destacando-se o isolado UPF C01 com maior severidade em relação ao isolado UPF C12. A partir desse estudo, já se pode ter um breve discernimento de como alguns cultivares de soja se comportaram diante da inoculação de *Cercospora* spp. No entanto, mais estudo devem ser realizado com as mesmas cultivares para outros isolados de *Cercospora* ou ainda diferentes cultivares para os mesmos isolados utilizado nesse estudo.

6.5 Conclusões

As cultivares de soja M8372 IPRO, NS6010 IPRO FD60, M5917 IPRO e M5947 IPRO, não apresentaram sintomas de CFC quando inoculadas com o isolado UPF C12.

As cultivares TMG7262 RR, BRS6203 RR e BRS5601 RR, apresentaram maior severidade da doença para o isolado UPF C01. Já para o isolado UPF C12 a cultivar com maior severidade foi a PIONEER 95R51.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados com *Cercospora* spp. comprovam a patogenicidade do fungo em plantas e em sementes de soja por meio do Postulado de Koch. Todos os isolados foram capazes de produzir cercosporina, mesmo em pequenas quantidades e, comprovaram ser patogênicos.

Todos os meios de cultura foram capazes de induzir o crescimento micelial e esporulação, mesmo que escassa, para os isolados de *Cercospora*. No entanto, mesmo com as condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo em laboratório, os meios de cultura não proporcionaram rápido crescimento e nem esporulação abundante. Ressalta-se que a escolha do meio de cultura irá depender da finalidade do trabalho, tendo em vista que, alguns meios induzem um maior crescimento micelial do que esporulação.

A concentração efetiva dos fungicidas foi variável entre os estudos. A realização dois experimentos reforça os dados obtidos da CE₅₀. Foi comprovado que há alteração da sensibilidade do fungo *C. cf. flagellaris* aos fungicidas IQe, SDHI e IST, ressalta-se que o monitoramento dos fungicidas IDM devem ser realizados com uma maior frequência, tendo em vista que o grupo químico triazol ainda é sensível ao fungo. Os fungicidas multissítio possuem baixo risco de resistência devido o seu mecanismo de ação, porém nesse estudo o fungicida clorotalonil se demonstrou atóxico à *C. cf. flagellaris* e o mancozebe foi moderadamente tóxico em condições *in vitro*. Fato que deve estar relacionado com o modo de ação do grupo químico, devendo esses dados serem correlacionados a sua eficiência no campo

A severidade das cultivares de soja foram baixas e não houve evolução dos sintomas, porém, este é o primeiro relato da avaliação dessa doença, em condições de casa de vegetação para 30 cultivares de soja brasileiras. A maioria dos estudos com

severidade do CFC é a nível de campo e fora do Brasil. Mesmo assim, foi possível identificar cultivares mais suscetíveis para o CFC.

Por fim, mais estudos devem ser realizados com o fungo *C. cf. flagellaris*, assim como para outras espécies, causadoras da MPS e do CFC, as informações disponíveis ainda são poucas e, a maioria dos trabalhos referem-se a *C. kikuchii* como a única espécie causadora dessas doenças. E diante do surgimento de um complexo de espécies de *Cercospora* que causam essas doenças em soja, o fitopatógeno deve ser melhor estudado e identificado, para auxiliar nos programas de melhoramento genético a obter cultivares resistentes a longo prazo e assim, auxiliar no manejo das doenças com os defensivos químicos disponíveis.

8 CONCLUSÃO GERAL

A partir da identificação molecular dos isolados de *Cercospora*, identificou-se as espécies *C. cf. flagellaris*, *C. canescens*, *C. dichondrae* e *C. helianthicola*, a espécie *C. kikuchii* não foi identificada nesse estudo. A partir dos Postulados de Koch, comprovou-se a patogenicidade dos isolados de *Cercospora* spp em soja. A germinação das sementes de soja infectadas pelo fungo não foi afetada para a maioria dos isolados utilizados nesse estudo. Mesmo em baixas concentrações, todos os isolados produziram a toxina cercosporina.

Os meios de cultura BDA, PDA e AAV proporcionaram maior IVCM e taxa de crescimento micelial para ambos os isolados de *C. cf. flagellaris*. Obteve-se maior esporulação dos isolados com os meios de cultura ACZ, AAV, AV8 e AEFS.

A concentração efetiva (CE_{50}) variou entre os fungicidas e entre os grupos químicos, para os isolados de *C. cf. flagellaris*. Os fungicidas IDM apresentaram menores valores de CE_{50} , os fungicidas ISDH e multissítio apresentam valores intermediários de CE_{50} e os fungicidas IQe e IST apresentaram os maiores valores de CE_{50} . Os isolados de *C. cf. flagellaris* utilizados nesse estudo foram sensíveis aos fungicidas do grupo químico IDM, insensíveis ao IQe, ISDH e IST. O bixafen foi o único ISDH que os isolados foram sensíveis. Dos multissítios, os isolados foram insensíveis ao clorotalonil e moderadamente sensíveis ao mancozebe.

O estudo da reação de cultivares de soja, demonstrou que o isolado UPF C01 foi mais agressivo que o UPF C12, mesmo ambos sendo da mesma espécie. Não foi observado sintomas do crestamento foliar de *Cercospora* nos cultivares de soja M8372, NS6010, M5917 e M5947 inoculadas com o isolado UPF C01. A severidade foi maior para os cultivares TMG7262, BRS6203 e BRS5601, inoculadas com o isolado UPF C01, enquanto, para o isolado UPF C12 a maior severidade foi no cultivar PIONEER 95R51.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Elsevier Academic Press Inc. New York, 2004. 922p.

ALBU, S.; SCHNEIDER, R. W.; PRICE, P. P.; DOYLE, V. P. *Cercospora cf. flagellaris* and *Cercospora cf. sigesbeckiae* are associated with Cercospora leaf blight and purple seed stain on soybean in North America. **Phytopathology**, v. 106, n. 11, p. 1376-1385, 2016.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2007.

ALLOATTI, J.; LI, S.; CHEN, P.; JAUREGUY, L. SMITH, S. F.; FLOREZ PALACIOS, L.; ORAZALY, M.; RUPE, J. Screening a diverse soybean germplasm collection for reaction to purple seed stain caused by *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease**, v. 99, n. 8, p. 1140 – 1146, 2015.

ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; SARTORI, F.; COSTAMILAN, L. M.; TEIXEIRA, M. R. O.; LOPES, M. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 594 – 602, 2005.

ALMEIDA, A. M. R.; SARAIVA, O. F.; FARIAS, J. R. B.; GAUDÊNCIO, C. A.; TORRES, E. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1231 – 1238, 2001.

AMORIM, L.; PASCHOALI, S. F. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. v. 1, 4. ed. São Paulo: Agrônomicas Ceres, 2011, p. 59-98.

AMTMANN, A.; TROUFFLARD, S.; ARMENGAUD, P. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 133, n. 4 p. 682-691, 2008.

ANDRADE, K. M. **Caracterização de fungos cercosporioides associados à vegetação mata atlântica e cercanias no estado do Rio de Janeiro**. 2016. 137 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

ANDRADE, M. V. R. F.; DEUSDARÁ, T. T.; SCHEIDT, G. N.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de cepas do fungo *Cunninghamella* sp. de solo do Sul do Tocantins, Brasil. **Biota Amazônica**, v. 5, n. 2, p. 58 – 64, 2015.

ÁVILA, Z. R.; PITELLI, R. A. Crescimento, esporulação e virulência do inóculo de *Cercospora piaropi*, agente de biocontrole do aguapé. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 189 – 192, 2004.

BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. **Persoonia**, v. 34, p. 65 – 86, 2015.

BALARDIN, R. S.; MADALOSSO, M. G.; STEFANELLO, M. T.; MARQUES, L. N.; DEBORTOLI, M. P. **Mancozeb: muito além de um fungicida**. Porto Alegre: Bookman, 2017.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minneapolis: Burgess, 1972, p. 241.

BORGES, L. L. **Filogeografia de espécies de *Cercospora* associadas ao crestamento foliar e a mancha púrpura da semente da soja**. 2016. 72 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. **Manual de análises sanitárias de sementes, anexo do capítulo 9 (Teste de sanidade de sementes) das Regas para Análise de Sementes**. 1. ed. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 200 p. v. 1. ISBN 978-85-99851-64-7.

BRENT, K. J. **Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-las?**. 1999. 54 f. FRAC Monografia, n. 1. Disponível em: <<https://www.frac-br.org/patogenos-de-plantas-cultivadas>>. Acesso em: 22 jul. 2020. ISBN 90-72398-07-6.

BRUNELLI, K. R.; FAZZA, A. C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L. E. A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zea-maydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, n. 1, p. 92-94, 2006.

BRUNIELLI, K. R.; FAZZA, A. C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L. E. A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zea-maydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, p. 92-94, 2006.

CAI, G. **Cercospora leaf blight of soybean: pathogen vegetative compatibility groups, population structure, and host resistance**. 2004. 78 f. Doctoral Dissertation (Doctor of Philosophy) - Louisiana State University, Louisiana, 2004.

CAI, G.; SCHNEIDER, R. W. Assessment of lineages of *Cercospora kikuchii* in Louisiana for aggressiveness and screening soybean cultivars resistance to *Cercospora* leaf blight. **Plant Disease**, v. 93, n. 9, p. 868-874, 2009.

CARMONA, M. A.; REIS, E. M. Critério: sistema de pontuação para aplicação de fungicidas para as doenças de final de ciclo na cultura da soja In: REIS, E. M. (Org.). **Crerios indicadores do momento para aplicação de fungicidas visando ao controle de doenças em soja e trigo**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 2009. p. 54-64.

CAROLLO, E. M.; SANTO FILHO, H. P. **Manual básico de técnicas fitopatológicas**. 1 ed. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016. p. 109.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos, v. 7 – Safra 2021/22, n. 3 – Terceiro levantamento**, Brasília, p. 1-99. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>>. Acesso em: 02 jan. 2022.

COOPERMAN, C. J.; JENKINS, S. F. Conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora asparagi* and *Cercospora* blight development in asparagus. **Phytopathology**, v. 76, n. 6, p. 617-622, 1986.

COSTA, I. F. D. **Controle de doenças de final de ciclo na cultura da soja**. 2005. 116 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributuín to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Phytopahtology**, v. 38, n. 1, p. 461-490, 2000.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K.-R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS (Federation European Microbiological Societies) Microbiol. Lett**, v. 252, p. 197-206, 2005.

DEBIASI, H.; FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; CONTE, O. **Diversificação de espécies vegetais como fundamento para a sustentabilidade da cultura da soja**. 1.ed. Londrina: Embrapa Soja, (Embrapa Soja Documentos, 366), 2015. 60 p. ISSN 2176-2937.

DEUNER, C.; NICOLINI, F.; CARLINI, R. C. História da evolução dos critérios de aplicação de fungicidas na cultura da soja no Brasil. In: REIS, E. M. (Org.). **Crerios indicadores do momento para aplicação de fungicidas visando ao controle de doerças em soja e trigo**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 2009. p. 27-30.

EDGINGTON, L. V.; KLEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971.

Embrapa Soja. **Soja em nmeros (Safra 2020/21)**. Disponvel em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Techonology, (Special Report, 80), p. 1 - 12, 1977.

FRAC. FRAC Code List, 2020: **Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering)**. Disponvel em: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-final.pdf?sfvrsn=8301499a_2>. Acesso em: 02 dez. 2021.

GALLI, J.A.; et al. Efeito de *Colletotrichum dematium* VAR. *truncata* e *Cercospora kikuchii* na germinao de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 27, n° 1, p.182- 187, 2005.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistncia de fungos a fungicidas**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2002, p. 78.

GODOY, C. V. Atualizaes no controle de doerças foliares na cultura da soja. **Summa Phytopathologica**, 2015, p. 1-2. Disponvel em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1010782/atualizacoes-no-controle-de-doencas-foliares-na-cultura-da>>

soja#:~:text=Autoria%3A%20GODOY%2C%20C.%20V.,da%20introdu%C3%A7%C3%A3o%20de%20novos%20pat%C3%B3genos>. Acesso em: 20 mai. 2021.

GODOY, C. V. Manejo de doenças em cultivos extensivos. In: **V CONBRAE – Congresso Brasileiro de Fitossanidade**, 2019. Disponível em: <<http://fitossanidade.fcav.unesp.br/seer/index.php/anaisconbrae/article/view/773>>. Acesso em: 23 abr. 2021.

GODOY, C. V. Manejo de doenças na cultura da soja. In: **Workshop CTC Agricultura – Resultados 2017**. Rio Verde: Centro Tecnológico Comigo, 2017. p. 25-30. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1074366>>. Acesso em: 10 jun. 2021.

GODOY, C. V.; PIMENTA, C. B.; MIGUEL-WRUCK, D. S.; RAMOS JUNIOR, E. U. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2006/2007. Resultados sumarizados dos ensaios em rede**. Londrina: Embrapa, 2007. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 42).

GODOY, C.V.; ALMEIDA, A. M. R.; SOARES, R. M.; SEIXAS, C. D. S.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M.; HENNING, A. A. Doenças da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Sociedade Brasileira de Fitopatologia** (SBF), p. 1-32, 2014.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p. 648-658, 2001.

GOULARTE, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília: Embrapa, 2018, 71 p. ISBN 978-85-7035-823-3.

GROENEWALD, J. Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J., SHIN, H. –D.; PRAK, J. –H.; JAMA, A. N.; GOENEWALD, M. BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**. v. 98, p. 115-170, 2013.

GULART, C. A. **Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav., a fungicidas sistêmicos**. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

GUTERRES, C.W.; SEIDEL, G.; GUBIANI, D.; MOREIRA, J; BASTOS, P.F.B. **Levantamento de fungos associados às sementes de soja e trigo nas safras agrícolas 2015, 2016 e 2017 no Rio Grande do Sul. 2017.** Disponível em: <[http://ioeste.com.br/brasil-agricultura-levantamento-de-fungos-associados-as-sementes-de-soja-e-trigo-nas-safras-agricolas-2015-2016-e-2017->](http://ioeste.com.br/brasil-agricultura-levantamento-de-fungos-associados-as-sementes-de-soja-e-trigo-nas-safras-agricolas-2015-2016-e-2017-). Acesso em: 10 abr. 2020.

HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops that feed the world 2. Soybean – worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Secur.**, v. 3, p. 5-17, 2011.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja.** 5.ed. Londrina: Embrapa Soja, (Embrapa Soja Documentos 256), 2014. 76 p. ISSN 1516-781X.

HOFFMANN, L. L.; REIS, E. M.; FORCELINI, C. A.; PANISSON, E.; MENDES, C. S.; CASA, R. T. Efeitos da rotação de cultura, de cultivares e da aplicação de fungicida sobre o rendimento de grãos e doenças foliares em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n.3, p. 245-251, 2004.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005.

KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 158-164, 2001.

KUDO, A. S. **Aerobiologia de conídios e manejo das cercosporioses da soja (*Glycine max*).** 2009. 86 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

KUDO, A. S.; BLUM, L. E. B. Reação de genótipos de soja ao crestamento foliar de *Cercospora*. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 397-401, 2011.

KUDO, A. S.; BLUM, L. E. B.; LIMA, M. A. Aerobiologia de *Cercospora kikuchii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1682-1688, 2011.

LOMBARDI, A. P. Z. **Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de *Cercospora coffeicola*.** 2002. 140 f. Dissertação

(Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2002.

LUPATINI, M.; MELLO, A. H. de; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do dna ribossômico do isolado de *Sclerotinia* UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex- maiden. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. esp., p. 2677-2682, 2008.

MACIEL, J. L. N.; DANELLI, A. L. D. Resistência genética de plantas a fungos. In: DALLAGNOL, L. J. (Org.). **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas: Ed. UFPel, 2018. p. 359-393.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-77, 1962.

MARTINS FILHO, S.; GRAVINA, G. A.; SEDIYAMA, C. S. Controle genético da resistência a raça 4 de *Cercospora sojina*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 12, p. 1727-1733, 2002.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. de. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 161-168, 1997.

MELLO, F. E. de; LOPES-CAITAR, V. S.; PRUDENTE, H.; XAVIERVALENCIO, S. A.; FRANZENBURG, S.; MEHL, A.; MARCELINO GUIMARÃES, F. C.; VERREET, J. A.; BALBI-PENNA, M. I.; GODOY, C. V. Sensitivity of *Cercospora spp.* from soybean to quinone outside inhibitors and methyl benzimidazole carbamate fungicides in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 69-80, 2021.

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

MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R. de.; BORGES NETO, C. **Desenvolvimento de metodologia para cultivo do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole de *Cyperus rotundus***. 1.ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 66), 2014. 27 p. ISSN 1676-1340.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E. J.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região do ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma spp.*

(Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

MINHO, A. P.; GASPAR, E. B.; DOMINGUES, R. **Guia prático para determinação de curva dose-resposta e concentração letal em bioensaios com extratos vegetais**. Bagé: Embrapa, (Embrapa Pecuária Sul. Comunicado Técnico, 93), 2016. 9 p. ISSN 1982-5382.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

ORTH, C.E.; SHUH, W. Resistance of 17 soybean cultivars to foliar, latent, and seed infection by *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease**, v.78, p.661-664, 1994.

PRICE, P. P., III, PURVIS, M. A., CAI, G., PADGETT, G. B., ROBERTSON, C. L., SCHNEIDER, R. W., and ALBU, S. Fungicide resistance in *Cercospora kikuchii*, a soybean pathogen. **Plant Disease**, v. 99, n. 11, p. 1596-1603, 2015.

PRICE, P. P., III. **Sensitivity and resistance of *Cercospora kikuchii*, causal agent of Cercospora leaf blight and purple seed stain of soybean, to selected fungicides**. 2013. 121 f. Doctoral Dissertations (Doctor in Philosophy) – Louisiana State University, Louisiana, 2013.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. 8 ed. Passo Fundo: Berthier, 2019.

REIS, E. M.; ZANATTA, M.; BRUSTOLIN, F.; DANELLI, A.L.D. Sensitivity reduction of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* to triadimenol fungicide applied in barley seed treatment. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 4, p. 276-280, 2013.

REY, M. S.; LIMA, N. B.; SANTOS, J.; PIEROBOM, C. R.; BALARDIN, R. S. Inoculação de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) com *Colletotrichum lindemuthianum* usando diferentes níveis de restrição hídrica. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 14, n. 4, p. 112-116, 2008.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. 2006. 249 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

R STUDIO TEAM. **R Studio: Integrated Development Environment for R**. R Studio, Inc., Boston, MA. Disponível em: <http://www.rstudio.com>. Acesso em: 10 abr. 2020.

SANTOS, A. da S. Caracterização morfológica de *Cercospora* e eficiência da toxina cercosporina na seleção de genótipos de pimenteiras ornamentais. 2015. 55 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.

SAUTUA, F. J. **Sensibilidad y resistencia a fungicidas de *Cercospora kikuchii*, agente causal del tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla de la soja**. 2021. 397 f. Tesis (Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales) – Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.35537/10915/127606>>. Acesso em: 03 jan. 2022.

SAUTUA, F. J.; DOYLE, V. P.; PRICE, P. P., III; PORFIRI, A.; FERNANDEZ, P.; SCANDIANI, M. M.; CARMONA, M. A. Fungicide resistance in *Cercospora* species causing *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybean in Argentina. **Plant Pathology**, v. 69, n. 9, p. 1678-1694, 2020a.

SAUTUA, F. J.; GONZALEZ, S. A.; DOYLE, V. P.; BERRETTA, M. F., GORDÓ, M.; SCANDIANI, M. M.; RIVAROLA, M. L.; FERNANDEZ, P.; CARMONA, M. A. Draft genome sequence data of *Cercospora kikuchii*, a causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybeans. **Data in Brief**, v. 27, 2019. Doi: 10.1016/j.dib.2019.104693.

SAUTUA, F. J.; SEARIGHT, J.; DOYLE, V.P.; SCANDIANI, M. M.; CARMONA, M. A. *Cercospora* cf. *nicotianae* is a causal agent of *Cercospora* leaf blight of soybean. **Eur J Plant Pathol**, v. 156, p. 1227–1231, 2020b. doi:10.1007/s10658-020-01969-z.

SCHUH, W. Influence of temperature and leaf wetness period on conidial germination in vitro and infection of *Cercospora kikuchii* on soybean. **Phytopathology**, v. 81, n. 10, p. 1315-1318, 1991.

SINGH, T.; SINCLAIR, J. B. 1984. Further studies on the colonization of soybean seeds by *Cercospora kikuchii* and *Phomopsis* sp. **Seed Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 71-77, 1986.

SOARES, A. P. G.; GUILLIN, E. A.; BORGES, L. L.; SILVA, A. C. T.; ALMEIDA, A. M. R.; GRIJALDA, P. E.; GOTTLIED, A. M.; BLUHM, B. H.; OLIVEIRA, L. O. More *Cercospora* species infect soybeans across the American tropics. **Plos One**, v. 10, n. 8, 2015.

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

SWIDERSKA-BUREK, U.; DAUB, M. E.; THOMAS, E.; JASZEK, M.; PAWLIK, A.; JANUSZ, G. Phytopathogenic cercosporoid fungi-from taxonomy to modern biochemistry and molecular biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 01-18, 2020.

TABUCHI, H.; TAJIMI, A.; ICHIHARA, A. Phytotoxic metabolites isolated from *Scolecotrichum graminis* Fuckel, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 1956-1959, 1994.

THUROW, L. B.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. da S. Melhoramento de plantas visando à resistência a patógenos. In: DALLAGNOL, L. J. (Org.). **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas: Ed. UFPel, 2018. p. 65-102.

TURNER, R. E.; EBELHAR, M. W.; WILKERS, T.; BELLALOU, N.; GOLDEN, B. R.; IRBY, J. T.; MARTIN, S. Effects of purple seed stain on seed quality and composition in soybean. *Plants*, v. 9, n. 8, p. 993, 2020.

UPCHURCH, R. G.; WALKER, D. C.; ROLLINS, J. A.; EHRENSHAFT, M.; DAUB, M.E. Mutants of *Cercospora kikuchii* in cercosporin synthesis and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2940-2945, 1991.

VELICHETI, R.K.; KOLLIPARA, K.P.; SINCLAIR, J.B. Selective degradation of proteins by *Cercospora kikuchii* and *Phomopsis longicolla* in soybean seed coats and cotyledons. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 8, p. 779-782, 1992.

WEBSTER, J.; WEBER, R. Introduction to fungi. 3 ed. Cambridge: Cambridge University, 2007. Doi: 10.1017/CBO9780511809026.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: **PCR protocols, a guide to methods and applications**. San Diego, CA, USA: Academic Press, Inc., p. 315-322, 1990.

XUE, H. Q.; UPCHURCH, R. G.; KWANYUEN, P. Relationships between oleic and linoleic acid content and seed colonization by *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum*. **Plant Diseases**, v. 92, p. 1038-1042, 2008.

YEH, C. C.; SINCLAIR, J. B. Sporulation and variation in size of conidia and conidiophores among five isolates of *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease**, v. 64, n. 4, p. 373-374, 1980.

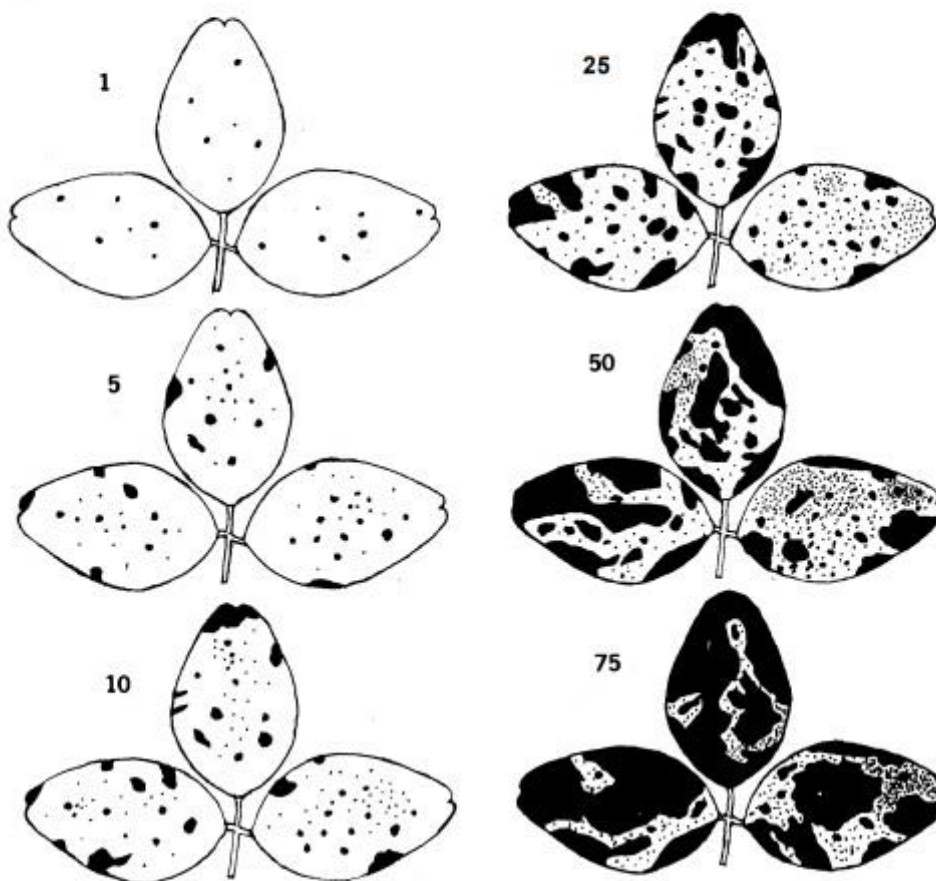
ZIVANOVIC, M.; WARD, B.; PRICE, P. P.; CHEN, Z-Y. Elucidation of factors contributing to *Cercospora* leaf blight onset during later reproductive development of soybean. **Plant Pathology**, v. 70, n. 9, p. 2074-2085, 2021.

ANEXOS

Anexo I – Escala diagramática de James (1971).

STEMPHYLIUM LEAF SPOT OF RED CLOVER

Key No. 24

**PERCENTAGE LEAF AREA COVERED****Use for:**

Leaf spot of red clover (*Stemphylium botryosum* Waltr.)
Target spot of red clover (*Stemphylium sarcinaeforme* (Cav) Wiltshire).

Procedure:

Assess individual leaves or plants or plants in small sample areas (ft², yd², m²).

Growth stages:

Before first and second cuts and at any other appropriate stages (see growth stage key).

Assessing severity:

Assess percentage leaf area affected (including defoliation due to disease, if any).

Nota: escala diagramática proposta por James (1971), utilizada para a avaliação percentagem da severidade do crestamento foliar de *Cercospora* em cultivares de soja, do Capítulo IV – Reação de cultivares de soja à *Cercospora* spp.



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia