

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

SENSIBILIDADE DE *Corynespora cassicola*,
ISOLADOS DA SOJA, A FUNGICIDAS *IN VITRO*

AVELINE AVOZANI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, março de 2011

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

SENSIBILIDADE DE *Corynespora cassicola*,
ISOLADOS DA SOJA, A FUNGICIDAS *IN VITRO*

AVELINE AVOZANI

Orientador: Prof. Ph.D. Erlei Melo Reis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, março de 2011



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



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Sensibilidade de *Corynespora cassiicola*, isolados da soja, à fungicidas *in vitro*”

Elaborada por

AVELINE AVOZANI

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Área de Fitopatologia

Aprovada em: 07/04/2011
Pela Comissão Examinadora

Dr. Erlei Melo Reis
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador

Dra. Carolina Cardoso Deuner
FAMV/UPF

Dr. Hercules Diniz Campos
FESURV

Dr. Vilson Antonio Klein
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV

A962s Avozani, Aveline
Sensibilidade de *Corynespora cassiicola*, isolados da
soja, a fungicidas in vitro / Aveline Avozani. – 2011.
133 f. : il. ; 25 cm.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade
de Passo Fundo, 2011.
Orientador: Prof. Ph.D. Erlei Melo Reis.

1. Soja - sementes. 2. Fungicidas. 3. Soja – doenças e
pragas. I. Reis, Erlei Melo, orientador. II. Título.

CDU: 633.34

Bibliotecária responsável Angela Saadi Machado - CRB 10/1857

“Leva tempo para alguém ser bem sucedido porque o êxito não é mais do que a recompensa natural pelo tempo gasto em fazer algo direito”

Joseph Ross

AGRADECIMENTOS

A Deus!

Sempre há muitos desafios, surpresas, tristezas e alegrias...
A vida é feita assim, às vezes nos deparamos com situações que nos afligem, nos fazem sentir medo e até mesmo chorar, mas saiba que a cada momento da vida, cada lágrima caída, cada sorriso dado, está tudo anotado no diário de Deus.

E pode ter certeza que nem um segundo Ele esqueceu de anotar, anotou suas lutas, seus choros, mas com um detalhe, Ele não esqueceu de anotar o dia de sua vitória!

obrigada!

À família!

Minha mãe Ladia pela ajuda, paciência e incentivo, ao meu pai Adelar e minha irmã Josiane pelo apoio, ao meu namorado Jeferson pelo carinho e por toda paciência durante esses dois anos,

obrigada!

Ao professor Erlei Melo Reis!

Por seu apoio, ensinamentos e pela primorosa orientação prestada,
obrigada!

À CAPES e ao PPGAgro!

Pela concessão da bolsa de estudos e pela oportunidade de realizar este curso,
obrigada!

Aos meus amigos!

Rosane Baldiga Tonin, Diana Erica Gomes, Anderson Danelli,
Gabriela Parizoto, Sandra Zoldan, Fernanda Nicolini, Elaine Deunner,
Camila Turra, Camila Ranzi, Juliane Câmera, Antonio Sergio
Ferreira, Vânia Bianchin, Ricardo, Andréia, Marília e Cristiane pelas
horas de descontração, pelo carinho e pelo auxílio na condução dos
trabalhos,
obrigada!

Aos professores e a banca!

Carlos A. Forcelini, Carolina Deuner, Hércules Diniz Campos,
Florindo Castoldi, Norimar Denardin, pelo auxílio fundamental nas
análises estatísticas, na realização da dissertação e nas sugestões
obrigada!

Aos funcionários da UPF!

Em especial a Cinara, Paulo e Mari pela colaboração e paciência,
obrigada!

Aos estagiários e equipe do laboratório!

Que de alguma forma contribuíram para a execução dos experimentos,
obrigada!

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	vi
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	01
ABSTRACT	02
1 INTRODUÇÃO	05
2 REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1 Mancha-alvo da soja.....	07
2.2 Ocorrência.....	08
2.3 Danos.....	09
2.4 Etiologia.....	10
2.5 Ciclo biológico de <i>Corynespora cassiicola</i>	11
2.5.1 Fontes de inóculo, sobrevivência e disseminação.....	11
2.5.2 Deposição, germinação, penetração e infecção.....	13
2.6 Sintomatologia.....	13
2.7 Medidas de controle.....	14
2.7.1 Controle genético.....	15
2.7.2 Controle cultural.....	16
2.7.3 Controle químico em sementes.....	17
2.7.4 Controle químico em órgãos aéreos.....	18
2.8 Fungitoxicidade e sensibilidade.....	19
2.9 Considerações sobre as dificuldades do manejo da mancha-alvo.....	23
 CAPÍTULO I	 24
Ocorrência de <i>Corynespora cassiicola</i> em soja nas safras 2009 e 2010.....	24
RESUMO	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Identificação do agente causal	28
2.2 Avaliação.....	29
2.3 Isolamento monospórico.....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4 CONCLUSÕES	36
CAPÍTULO II	37
Patogenicidade de cinco isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em soja.....	
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Cultivo das plantas.....	42
2.2 Multiplicação do inóculo.....	42
2.3 Inoculação em plantas de soja.....	43
2.4 Mensuração dos conídios.....	44
2.5 Avaliação da doença.....	44
2.6 Reisolamento do fungo de folhas com sintomas da mancha-alvo.....	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4 CONCLUSÕES	51
CAPÍTULO III	52
Sensibilidade miceliana de <i>Corynespora cassiicola</i> , isolados da soja, a fungicidas triazóis e benzimidazóis, <i>in vitro</i>	
RESUMO	52
ABSTRACT	53
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 Efeito <i>in vitro</i> de fungicidas sobre o crescimento miceliano de <i>Corynespora cassiicola</i>	58
2.2 Avaliação.....	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4 CONCLUSÕES	71
CAPÍTULO IV	73
Sensibilidade da germinação de esporos de <i>Corynespora cassiicola</i> , isolados da soja, a fungicidas estrobilurinas, <i>in vitro</i>	
RESUMO	73
ABSTRACT	74
1 INTRODUÇÃO	76

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1 Determinação da sensibilidade da germinação de esporos de <i>Corynespora cassicola</i> a fungicidas, <i>in</i> <i>vitro</i>	79
2.2 Avaliação da germinação dos conídios.....	80
2.3 Análise estatística.....	81
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
CAPÍTULO I		
1	Identificação dos isolados monospóricos de <i>Corynespora cassiicola</i>	30
2	Relação de populações de <i>Corynespora cassiicola</i> , incidência e frequência nas amostras recebidas nos anos de 2009/2010.....	32
CAPÍTULO II		
1	Identificação dos isolados monospóricos de <i>Corynespora cassiicola</i>	42
2	Número de lesões/folíolo e diâmetro das lesões de cinco isolados monospóricos de <i>Corynespora cassiicola</i> em folíolos de soja.....	48
3	Menor, maior e médias do comprimento, largura e número de pseudoseptos de esporos de cinco isolados monospóricos de <i>Corynespora cassiicola</i>	49
CAPÍTULO III		
1	Fungicidas utilizados para determinar a sensibilidade, <i>in vitro</i> , de cinco isolados de monospóricos de <i>Corynespora cassiicola</i>	57
2	Identificação dos isolados monospóricos de <i>Corynespora cassiicola</i>	58
3	Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida carbendazim.....	61

4	Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida ciproconazol.....	62
5	Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida tebuconazol.....	62
6	Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida flutriafol.....	63
7	Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida epoxiconazol.....	63
8	Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de fungicidas para cinco isolados de <i>Corynespora cassicola</i>	68
 CAPÍTULO IV		
1	Identificação dos isolados monospóricos de <i>Corynespora cassicola</i>	79

2	Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % da germinação dos esporos (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida azoxistrobina.....	83
3	Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % da germinação dos esporos (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida piraclostrobina.....	83
4	Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % da germinação dos esporos (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de <i>Corynespora cassicola</i> para o fungicida picoxistrobina.....	84
5	Concentração inibitória de 50% (CI_{50}) da germinação dos conídios de isolados de <i>Corynespora cassicola</i> a fungicidas.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		
1	Ciclo das relações patógeno-hospedeiro de <i>Corynespora cassicola</i> em soja.....	12
CAPÍTULO II		
1	Sintomas da mancha foliar causada por <i>Corynespora cassicola</i> com anéis concêntricos semelhantes a um alvo.....	47
CAPÍTULO III		
1	Crescimento miceliano de <i>Corynespora cassicola</i> – Isolado 01/MG em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida carbendazim.....	65
2	Crescimento miceliano de <i>Corynespora cassicola</i> – Isolado 21/MS em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida carbendazim.....	66

SENSIBILIDADE DE *Corynespora cassiicola*, ISOLADOS DA SOJA, A FUNGICIDAS *IN VITRO*

AVELINE AVOZANI¹

RESUMO – A mancha-alvo da soja pode causar danos de até 50%, representando uma ameaça sobre condições de clima favoráveis, principalmente na região Centro-Oeste do país. As medidas preferenciais de controle para esta doença são o uso de cultivares com resistência e o controle químico na parte aérea. Nas últimas safras verificou-se a baixa eficiência do controle da doença, levantando-se a hipótese de que poderia ser devido à redução ou perda da sensibilidade do fungo aos fungicidas. Assim, objetivou-se avaliar a sensibilidade de *Corynespora cassiicola* para fungicidas do grupo químico dos triazóis, benzimidazóis e estrobilurinas, *in vitro*. Primeiramente, fez-se um levantamento da ocorrência de *C. cassiicola* nas amostras recebidas nos anos de 2009 e 2010, em câmara úmida. Realizaram-se isolamentos monospóricos para cinco isolados, bem como, os postulados de Koch. A sensibilidade miceliana foi realizada *in vitro* utilizando placas de petri com meio de cultura potato dextrose ágar (PDA) mais a suspensão fungicida nas concentrações de 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 20 e 40 mg/L. Para a germinação dos conídios o procedimento foi o mesmo, sendo utilizado o meio de cultura ágar-ágar. Os fungicidas testados para o crescimento miceliano foram carbendazim, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol e tebuconazol.

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração Fitopatologia.

Para a germinação dos esporos os ingredientes ativos foram azoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobina. A CI_{50} , concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano e da germinação de esporos foi calculada pela equação gerada por análise de regressão, logarítmica. Comparando os sintomas da doença com descrições da literatura e com a mensuração dos conídios confirmou-se a patogenicidade de *C. cassiicola*. Os resultados mostraram que para o ingrediente ativo carbendazim ocorreu perda da sensibilidade para três isolados oriundos do Estado do Mato Grosso do Sul. Os valores da CI_{50} para os triazóis e estrobilurinas foram variáveis e mostraram redução da sensibilidade para alguns isolados de *C. cassiicola*. Os isolados apresentaram comportamento diferenciado com relação aos fungicidas. Os valores da CI_{50} determinados neste trabalho podem ser utilizados como fator de referência para o monitoramento da sensibilidade de *C. cassiicola* a fungicidas.

Palavras-chave: Patogenicidade, fungitoxicidade, benzimidazol, triazol, estrobilurinas.

***IN VITRO* SENSITIVITY OF *Corynespora cassiicola*, ISOLATED FROM SOYBEAN, TO FUNGICIDES**

ABSTRACT – The soybean target spot can cause damage up to 50%, representing a threat to crop productivity under favorable weather conditions, mainly in the Midwest region of the country. The preferential control measure of this disease are the use of resistant

cultivars and chemicals applied to above ground plant parts. In recent growing seasons have been noticed low control efficiency, raising the hypothesis that it could be due to reduced/loss of of the fungus sensitivity to fungicides. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* sensitivity of *Corynespora cassiicola* to the chemical group of triazole, benzimidazole and strobilurin fungicides. First, was done a survey of the occurrence of *C. cassiicola* in samples taken in the years 2009 and 2010. Monosporic isolation was performed for five isolates, as well as Koch's postulates. The mycelial sensitivity was performed in vitro using plastic petri dishes with potato dextrose agar medium amended with the fungicide suspension at concentrations of 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 20 and 40 mg/L. For conidial germination the same procedure was followed using water agar substratum. The tested fungicides for mycelial growth were carbendazim, cyproconazole, epoxiconazole, flutriafol and tebuconazole. For spore germination test the active ingredients azoxystrobin, and pyraclostrobin picoxystrobin fungicides were tested. The inhibitory concentration (IC₅₀) of 50 % mycelial growth and spore germination inhibition was calculated by the equation generated by logarithmic regression analysis. Comparing the symptoms of the disease with the literature descriptions and conidia measurements confirmed the pathogenicity of *C. cassiicola* to soybean. The results showed the lost of sensitivity for the active ingredient carbendazim for three isolates from the State of Mato Grosso do Sul. The IC₅₀ values for the triazole and strobilurin were variable and showed sensitivity shift to some isolates of *C. cassiicola*. The isolates showed different sensitivity behavior to the fungicides.

The IC₅₀ values determined in this work can be used as a reference factor for monitoring the sensitivity of *C. cassicola* to fungicides.

Key words: Pathogenicity, fungitoxicity, benzimidazole, triazole, strobilurin.

1 INTRODUÇÃO

Originária do continente asiático a soja [*Glycine max* (L.) Merrill], tem como provável origem a região central e ocidental da China. No Brasil, a cultura foi introduzida no Estado da Bahia, em 1882, mas foi no Rio Grande do Sul que esta oleaginosa passou a ser cultivada em larga escala. A disponibilidade de terras baratas e o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a agricultura fizeram com que na década de 70 a soja tivesse uma expansão rápida na região Centro-Oeste (BLACK, 2000).

As perspectivas de condições meteorológicas favoráveis na safra 2010/2011, aliadas aos bons preços, propiciam otimismo aos produtores que ampliaram a área de cultivo. O incremento na área cultivada foi observado em vários Estados, destacando-se o Estado de Mato Grosso onde se prevê um crescimento de 147,3 mil hectares, seguido pelo Paraná, 128,1 mil hectares e o Rio Grande do Sul com crescimento de 79,5 mil hectares (CONAB, 2011).

Dentre as doenças que incidem na cultura da soja, a mancha-alvo, agente causal *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis), Wei (1950), vem ganhando importância, principalmente na região Centro-Oeste, em função dos danos que pode ocasionar. O fungo apresenta uma ampla gama de hospedeiros, sobrevive em hastes, raízes, sementes e em áreas de pousio por dois anos ou mais. Além disso, pode permanecer saprofiticamente em restos culturais de um grande número de espécies vegetais (SINCLAIR & BACKMAN, 1989).

Esta doença é favorecida pelo plantio de cultivares suscetíveis, monocultura da soja, plantio direto e chuvas frequentes na fase vegetativa. A preocupação se deve principalmente pelas opções limitadas de controle com fungicidas, uma vez que os benzimidazóis recomendados para o controle da mancha-alvo tem se apresentado com menor eficiência, em variedades suscetíveis (EMBRAPA, 2010).

Em relação às medidas de controle, alguns trabalhos de pesquisa, em condições de campo, têm sido desenvolvidos, visando o controle químico da mancha-alvo, principalmente, testando a eficiência de diferentes fungicidas e identificando o melhor momento para a sua aplicação (MOREIRA et al., 2010).

Por outro lado, no que se refere a pesquisas para o desenvolvimento de metodologias de pesquisa em condições de laboratório ou em ambiente controlado, muitas informações ainda precisam ser geradas, principalmente dentro do patossistema *C. cassiicola* x soja. Entretanto, informações sobre a fungitoxicidade de substâncias químicas para o fungo *C. cassiicola* é uma importante informação para este patossistema.

A fungitoxicidade de uma determinada substância tóxica é quantificada pela DE_{50} (dose efetiva), ou CE_{50} (concentração efetiva), ou CI_{50} (concentração inibitória), e se refere à concentração do ingrediente ativo que inibe 50% do crescimento miceliano ou da germinação de esporos (SHARVELLE, 1961; EDGINGTON et al., 1971; REIS et al., 2010).

Sendo assim, após relatos de falhas do controle desta doença nas últimas safras na região Centro-Oeste do Brasil, onde vem se verificando a baixa eficiência do controle químico, mesmo após

suscessivas aplicações de fungicidas, levantou-se a possibilidade da ocorrência do surgimento da redução ou perda da sensibilidade do fungo a fungicidas. Para verificar esta hipótese realizaram-se estudos *in vitro*, visando testar a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola*, obtidos de soja, a fungicidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mancha-alvo da soja

A mancha-alvo da soja e a podridão radicular de *Corynespora* são doenças que podem ser atribuídas à mesma espécie, *Corynespora cassiicola*. Estudos de Spencer & Walters (1969) utilizando 14 isolados monoconidiais, obtidos nos Estados Unidos, determinaram através da inoculação em soja e feijão, a existência de duas raças distintas de *C. cassiicola*. Segundo os autores, as diferenças morfológicas, patogênicas e culturais entre esses isolados sugeriram a existência de variação em nível de espécie. Estes relataram ainda que isolados obtidos de raiz e haste, não infectam folhas, enquanto os provenientes de folhas não infectam raízes de soja. Da mesma forma, Sinclair & Shurtleff (1975), descrevem que devido às diferenças morfológicas, o isolado que infecta hipocótilo, raízes e hastes, provavelmente trata-se de uma espécie diferente daquela que infecta folhas, vagens e sementes.

Por outro lado, Yorinori (1989), descreve que isolados de *C. cassiicola* obtidos de infecções radiculares podem causar manchas foliares, porém, estudos mais detalhados são necessários para

confirmar se o fungo que causa a mancha foliar e a podridão de raiz são os mesmos.

Botta (1989) isolou e identificou fungos de sementes de soja de diferentes áreas do Noroeste da Argentina, determinando a frequência e porcentagem das sementes infectadas. Entre os fungos encontrados, inclui *C. cassicola*, sendo essa a primeira citação de sua ocorrência como patógeno de sementes em soja.

2.2 Ocorrência

O fungo já foi relatado em mais de 300 espécies de plantas (FARR et al., 2011) cultivadas em mais de 70 países de clima tropical e subtropical (SILVA et al., 1995; FARR et al., 2011). Em razão da diversidade de hospedeiros e da distribuição geográfica ampla, Ellis (1971) descreveu esta espécie como cosmopolita e inespecífica. Entretanto, outros autores descrevem *C. cassicola* como sendo específica para determinados hospedeiros como citaram Spencer & Walter (1969).

O primeiro relato da mancha-alvo, na cultura da soja, foi feito nos Estados Unidos em 1945 por Olive et al. (1945), causando danos em diversos Estados.

No Brasil, de acordo com Veiga (1978) citado por Almeida et al. (1976) a mancha-alvo foi constatada primeiramente no Estado de São Paulo. Por outro lado, Yorinori (1977) afirma que, segundo informação pessoal repassada por Kiihl, a mancha-alvo foi identificada pela primeira vez no Brasil, no Estado do Mato Grosso, em 1974. No Rio Grande do Sul, sua ocorrência foi identificada por

Veiga (1978) em áreas de ensaios do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Na safra 1987/88, a mancha-alvo foi constatada nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (YORINORI, 1989).

2.3 Danos

A mancha-alvo é encontrada na maioria das áreas produtoras de soja no Brasil. O fungo pode atacar as raízes, as hastes, as vagens e principalmente as folhas das plantas, onde causa a redução da área fotossintética em função das lesões foliares, e principalmente pela desfolha precoce (ALMEIDA et al., 1997; SILVA et al., 2008).

Estudos realizados por Hartwig (1959) revelaram que os danos causados pela mancha-alvo variaram de 18 a 32%, no Delta do Mississipi, num período de cinco anos. Durante os outros cinco anos a precipitação pluvial foi abaixo da normal e a doença não se desenvolveu o suficiente para causar desfolha.

Na safra 2004 nos EUA, os danos estimados para a mancha-alvo foram de 20 a 40% em várias lavouras de soja (KOENNING & CRESWELL, 2006).

No Brasil durante a safra 1995/96, foi verificada a ocorrência desta doença em diversas propriedades nos municípios do Estado do Paraná causando desfolha aos 20 a 25 dias após a emergência e danos estimados entre 40 a 45% (YORINORI, 1996).

Contudo, Panique (2007) relatou que em algumas regiões do Brasil os danos chegaram a 50%.

Trabalhos conduzidos pela Universidade de Rio Verde (FESURV) no Estado de Tocantins evidenciaram que os danos podem variar de 10% a 20% (SILVA et al., 2008).

Portanto, tendo em vista os trabalhos citados, a mancha-alvo pode ocasionar danos significativos na cultura da soja, que variam de 10 a 50%. No entanto, ainda não foi gerada a função matemática de dano para este patossistema.

2.4 Etiologia

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis), Wei (1950) é o agente causal da mancha-alvo da soja. O fungo pertence à classe dos *Deuteromicetos*, subclasse *Hyphomicetidae*, família *Dematiaceae*, gênero *Corynespora* e espécie *Corynespora cassiicola* (BARNET & HUNTER, 1972).

Inicialmente *C. cassiicola* foi classificado como: *Cercospora melonis* Cooke, *Cercospora vignicola* Kawamura, *Helminthosporium vignae* Olive, etc (SINCLAIR & BACKMAN, 1989).

Quanto à etiologia, Viegas (1979) descreve *Corynespora* (coryne = massa clava e spora = esporo), ou seja, esporo clavado. Quanto a espécie *cassiicola* Wei (1950), relata que o fungo foi isolado de planta do gênero *Cassia* sp., em 1869, por Charles Wright. A terminação *icola* significa viver ou se desenvolver (ULLOA &

HANLIN, 2000). Portanto, a palavra *cassiicola* significa “viver em cássia”.

O patógeno apresenta conidióforos eretos, ramificados, de coloração pálida a marrom, com até vinte septos medindo 110-850 μm Ellis (1971) ou 44-350 μm de comprimento Hartman al. (1999) por 4-11 μm de largura.

Os conídios podem ser isolados ou em cadeia de dois a seis com coloração parda, dilatados na base, retos ou ligeiramente curvados, com 4 a 20 pseudoseptos, medindo de 40-220 μm de comprimento (em meio de cultura pode chegar a 520 μm) x 9-22 μm de espessura (ELLIS, 1971).

Em meio de cultura o micélio é imerso, sem estroma, branco e floculento, tornando-se mais tarde cinza escuro e constituído de um emaranhado preto oliváceo (SINCLAIR & BACKMAN, 1989; ELLIS, 1971).

Hartman et al. (1999) descrevem que o patógeno apresenta estruturas de repouso, os clamidósporos, que podem ser intercalares ou terminais, hialinos, podendo ser encontrados em colônias envelhecidas.

2.5 Ciclo biológico de *Corynespora cassiicola*

2.5.1 Fontes de inóculo, sobrevivência e disseminação

O fungo *Corynespora cassiicola* é um patógeno necrotrófico apresentando uma fase parasitária sobre a planta hospedeira e outra, saprofítica sobre seus restos culturais (Figura 1).

Este fungo pode sobreviver em sementes, em restos culturais e em hospedeiros alternativos (Fig.1; 1 e 3) (SINCLAIR & BACKMAN, 1989). A remoção e disseminação dos conídios de *C. cassicola* dos órgãos infectados ocorre principalmente pelo vento (Fig.1: 5). Os respingos de chuva também são responsáveis pela disseminação deste patógeno a curtas distâncias (SILVA et al., 2008).

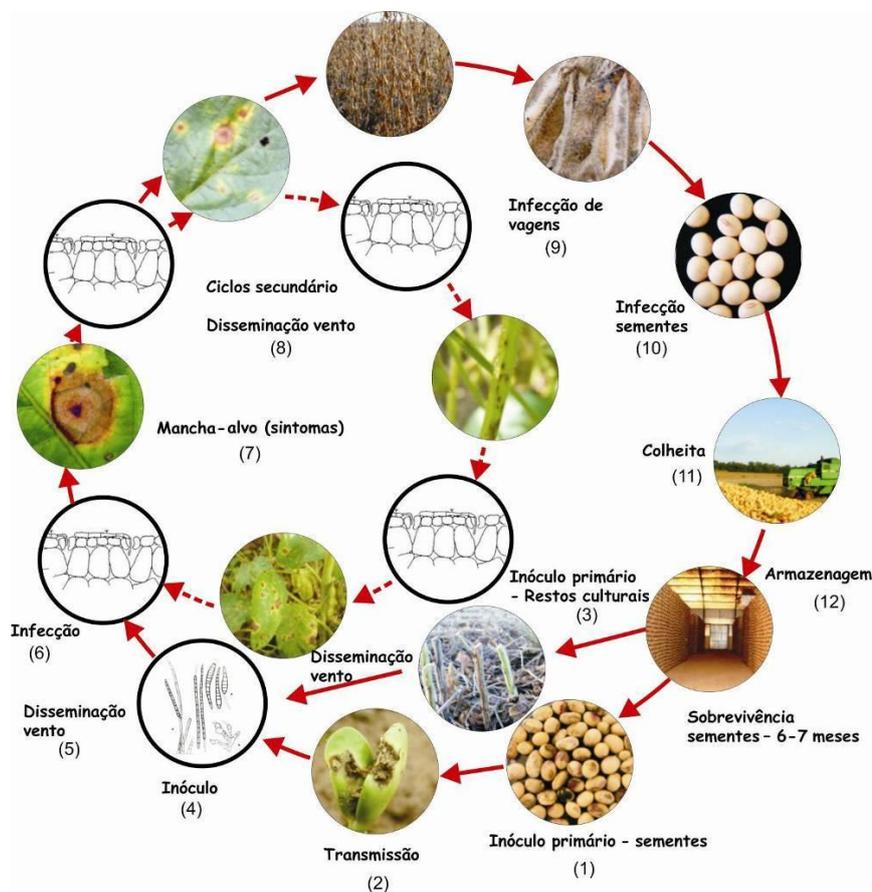


Figura 1: Ciclo das relações patógeno-hospedeiro de *Corynespora cassicola* em soja (Danelli et al., 2009)¹.

¹ Danelli A. Mestrando em Agronomia - Fitopatologia/UPF
 Avozani, A. Mestranda em Agronomia - Fitopatologia/UPF.
 Reis, E. M. Professor Ph. D. da Universidade de Passo Fundo/UPF.

2.5.2 Deposição, germinação, penetração e infecção

A deposição dos conídios de *C. cassicola* ocorre quando atingem uma planta hospedeira (Fig.1: 6). Uma vez depositados sobre a folha, os conídios aguardam a ocorrência de molhamento foliar e temperatura de 22 a 30°C para germinarem e penetrarem nos tecidos do hospedeiro (SILVA et al., 2008; MULITERNO de MELO, 2009).

Uma vez presente na planta hospedeira, este fungo libera toxinas para matar os tecidos adjacentes ao local da infecção, onde, a partir daí, extrai os nutrientes e se reproduz formando novos esporos (FORCELINI, 2010).

2.6 Sintomatologia

Os sintomas nas folhas inicialmente se caracterizam por pequenos pontos necróticos, inferiores a 1 mm de diâmetro, circundados por um halo amarelado. Os sintomas da doença são característicos após o desenvolvimento pleno das lesões (Fig. 1: 8). Quando as condições ambientais são adequadas, as lesões se expandem e evoluem para manchas de formato arredondado ou irregular, variando em tamanho, podendo chegar a 15 mm de diâmetro. Muitas vezes as lesões quando completamente desenvolvidas, apresentam anéis concêntricos de tecidos mortos circundados por um halo de coloração verde amarelado muito similar a um alvo. Por esse fato, o nome comum da doença de mancha-alvo. Em cultivares suscetíveis pode-se observar lesões necróticas nas vagens, pecíolos e hastes com formato alongado. Dependendo do

cultivar pode haver abertura das vagens e exposição dos grãos que podem germinar (SILVA et al., 2008; SINCLAIR & BACKMAN, 1989).

A podridão de raiz é caracterizada por uma podridão seca iniciando por uma mancha de coloração vermelho arroxeada no tecido cortical, evoluindo para coloração negra. Em plantas mortas e em solo úmido, o fungo produz abundante esporulação, o que permite identifica-lo com facilidade, por meio dos sinais.

Isolados de *C. cassiicola* obtidos de infecções radiculares podem causar manchas foliares, porém, estudos mais detalhados são necessários para confirmar se a espécie que causa podridão de raiz e mancha foliar é a mesma (YORINORI, 1998).

2.7 Medidas de controle

As perdas causadas pelas doenças de planta estão entre as principais causas da redução financeira na agricultura (MULITERNO de MELO, 2009). O manejo integrado para uma doença consiste na utilização de todas as estratégias disponíveis dentro de um programa unificado, de modo a manter as populações do patógeno abaixo do limiar de dano econômico (LDE), procurando-se, ao mesmo tempo, minimizar os efeitos negativos ao meio ambiente (ZAMBOLIM & JUNQUEIRA, 2004, apud NAS, 1969).

Levando-se em consideração a importância da cultura da soja para a produção brasileira de grãos e que a produtividade é limitada pela incidência da mancha-alvo, torna-se necessário a utilização de um conjunto de técnicas que vizem o controle desta

doença. Pode-se destacar dentre as principais estratégias, a rotação de culturas, o uso de cultivares resistentes, tratamento de sementes e proteção de órgãos aéreos com fungicidas (SILVA et al., 2008).

2.7.1 Controle genético

Silval et al. (2008) relatam que para o manejo de qualquer doença, não se deve utilizar o mesmo cultivar em mais de 30% da área. Pois, a uniformidade genética pode favorecer o patógeno, ao vencer a resistência do cultivar.

Godoy¹, informações pessoais, relatou que trabalhos publicados sobre o uso de cultivares resistentes a mancha-alvo, até o momento, são poucos, isso devido, os cultivares que já foram lançados apresentar boa resistência, mesmo sem ter trabalho específico para isso. Contudo, os cultivares BMX Potência, Nideira 5909 e CD 219 são suscetíveis a esta doença, em observações de campo.

Roim (2001) testou a reação de 350 cultivares de soja à mancha-alvo. Os resultados encontrados foram de 122 cultivares resistentes, 159 moderadamente resistentes, 62 moderadamente suscetíveis e 7 suscetíveis.

De acordo com dados da EMBRAPA (2007) citado por Silva et al. (2008), existem 325 cultivares de soja registradas, sendo que a reação à mancha-alvo é conhecida apenas para 97. Destas 3,7% possuem reação de resistência e 12% são consideradas moderadamente resistentes.

¹ GODOY, C. V. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa – Londrina/PR (2001).

O aumento da intensidade da mancha-alvo pode ser explicado devido a fatores relacionados ao melhoramento genético no desenvolvimento de novas cultivares. Os programas de melhoramento, normalmente buscam a resistência a nematóides, como o do cisto (*Heterodera glycines* Ichinohe) amplamente disseminado na região Centro-Oeste do país. Se por um caminho o melhoramento genético obtém sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes para esse nematóide, por outro, estes cultivares apresentam suscetibilidade a *C. cassiicola* (SILVA et al., 2008).

Portanto, como o plantio de cultivares com resistência representa a melhor alternativa de controle no manejo integrado, é essencial que os programas de melhoramento genético elejam também a resistência a mancha-alvo como uma prioridade.

2.7.2 Controle cultural

A rotação de culturas é o cultivo alternado de espécies vegetais diferentes no mesmo local e na mesma estação anual. O princípio do controle envolvendo a rotação de culturas baseia-se na supressão ou eliminação do substrato apropriado para o patógeno, na fase saprofítica. A ausência da planta cultivada anualmente leva à erradicação total ou parcial dos patógenos necrotróficos que dela são dependentes (REIS & FORCELINI, 1995).

A manutenção de restos culturais na superfície do solo, como no plantio direto, prolonga a viabilidade dos patógenos necrotróficos e sua permanência na lavoura. Costamilan et al. (1999) em trabalho conduzido na região Sul do Brasil, relatam que foram

necessários 27 meses para que os restos culturais da soja fossem totalmente decompostos.

Almeida et al. (2005) cita a rotação de culturas com milho e espécies de gramíneas, que não sejam hospedeiras para este patógeno. Portanto, nas regiões do cerrado onde predomina a monocultura da soja, torna-se necessária, a rotação de culturas com milho ou outras espécies de gramíneas na safra de verão, para que haja uma quebra no ciclo da doença, já que o patógeno é necrotrófico e sobrevive nos restos culturais dos hospedeiros. Os altos preços da soja dificultam a prática da rotação soja/milho.

2.7.3 Controle químico em sementes

A semente é a principal fonte de inóculo primário para fungos e bactérias necrotróficos que atacam os órgãos aéreos das plantas. Portanto, o tratamento de sementes tem o objetivo de eliminar o inóculo veiculado pela semente, embora seja difícil a erradicação (controle de 100%) (REIS et al., 2010).

Para o tratamento de sementes de soja, visando *C. cassiicola* recomenda-se a utilização da associação de carbendazim (150 g/L SC) e tiram (350 g/L SC) na dose de 200 mL do produto comercial para 100 Kg de sementes (REIS et al., 2010). Mas, devido aos relatos de menor eficiência do carbendazim, para o controle de *C. cassiicola* nas últimas safras, o uso desse ingrediente ativo pode ficar comprometido para o tratamento de sementes.

Porém, segundo a literatura consultada, ainda não foi claramente comprovada, a eficiência da transmissão de *C. cassiicola* da semente para os órgãos aéreos da soja.

2.7.4 Controle químico em órgãos aéreos

Até o momento não estão disponíveis indicações para o controle químico específico para esta doença em soja. Os fungicidas indicados são os mesmos recomendados para o controle do complexo de doenças de final de ciclo (CDFC), sendo os seguintes ingredientes ativos: azoxistrobina, azoxistrobina + ciproconazol, carbendazim, difeconazol, flutriafol, piraclostrobina + epoxiconazol, tiofanato metílico + flutriafol, trifloxistrobina + ciproconazol e trifloxistrobina + propiconazol (EMBRAPA, 2007).

De acordo com informações de técnicos e pesquisadores da região Centro-Oeste, tem se questionado a eficiência do controle químico da mancha-alvo. Mesmo com várias aplicações de fungicidas o controle não tem sido satisfatório.

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

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

2.8 Fungitoxicidade e sensibilidade

Por definição, fungicidas são substâncias químicas de origem natural ou sintética que quando aplicados às plantas protegem-nas da penetração e/ou posterior desenvolvimento de fungos patogênicos e microorganismos pertencentes ao Reino Eustramenópila (antigos fungos da classe Oomicetos), em seus tecidos. Uma substância química, para ser considerada fungicida, não necessita obrigatoriamente matar o fungo. Algumas controlam as doenças inibindo o crescimento miceliano e ou a esporulação (GHINI & KIMATI, 2000; REIS et al., 2010).

A fungitoxicidade é um atributo atrelado à molécula química em função de suas características. Um fungo, por sua vez, em função de suas características genéticas apresenta, ou não, sensibilidade a uma dada molécula. Se um fungo for sensível a um fungicida, este apresenta fungitoxicidade, em caso contrário, é atóxico. Se o fungicida não apresenta fungitoxicidade, o fungo é, então, considerado insensível (REIS et al., 2010).

A sensibilidade é o oposto de resistência, pois todas as linhagens resistentes apresentam uma redução da sensibilidade, porém, a palavra insensibilidade não deve ser usada como sinônimo de resistência, pois esse termo sugere a completa falta de sensibilidade e só deve ser usado para descrever fungos para os quais os fungicidas nunca tiveram nenhum efeito (GHINI & KIMATI, 2000).

O termo CI_{50} corresponde à concentração inibitória que promove um efeito desejado (ou grau de resposta) em 50% dos microrganismos submetidos ao ensaio experimental (OGA et al., 2008; REIS et al., 2010).

Edgington et al. (1971) propõem os seguintes critérios para classificar uma substância fungicida, com relação a fungitoxicidade: substância que apresenta $CI_{50} < 1$ mg/L = altamente fungitóxica; com CI_{50} entre 1 mg/L e 50 mg/L = moderadamente fungitóxica e com $CI_{50} > 50$ mg/L = não tóxica.

Se a CI_{50} de um fungicida, ao longo do tempo, apresentar alteração para valores superiores aos inicialmente estabelecidos, visando o controle de um determinado patógeno, poderá indicar redução na sensibilidade aquele fungicida (REIS et al., 2010).

Conforme Staub & Sozzi (1984), a primeira e talvez a mais difícil tarefa no desenvolvimento de um novo fungicida é estimar o risco inerente de resistência a um certo patógeno podendo-se, para isto, realizar-se estudos laboratoriais *in vitro* ou *in vivo* ou monitoramentos precoces em resultados e considerações sobre parâmetros epidemiológicos.

O desenvolvimento da resistência depende da frequência e do grau de resistência. A frequência corresponde à proporção da

população que é composta por linhagens resistentes e o grau de resistência é a magnitude da diferença de sensibilidade das linhagens sensíveis e resistentes, sendo que o mesmo pode ser expresso pelo fator de resistência (FR) (REIS et al., 2010).

A resistência pode ser chamada de qualitativa, quando ocorrer abruptamente pela modificação de um único gene do patógeno, resultando em ineficácia do fungicida, mesmo em doses mais altas que a normal. Também pode ser denominada de oligogênica, sendo governada por um conjunto de genes dominantes podendo ser quebrada quando fungicidas com modo de ação específico são empregados no campo (REIS et al., 2010).

A resistência quantitativa é assim chamada, quando decorre da interação de vários genes menores e se caracteriza por redução gradativa da eficácia, eventualmente recuperada pelo uso de doses mais elevadas, também é conhecida como multigênica, pois é governada por um conjunto de genes com efeitos menores e relaciona-se mais com fungicidas com risco moderado (REIS et al., 2010).

A resistência cruzada refere-se à resistência a dois ou mais fungicidas, conferidas pelo mesmo fator genético. Quando o fator genético estabelece resistência a um determinado fungicida, e ao mesmo tempo, aumenta a sensibilidade a um segundo fungicida, diz-se que a resistência é cruzada negativamente correlacionada.

Existe ainda a resistência múltipla, onde fatores genéticos diferentes conferem resistência a dois ou mais fungicidas com mecanismos de ação distintos (GHINI & KIMATI, 2000). Esta é definida como resistência a dois ou mais fungicidas conferida por

diferentes fatores genéticos, implicando que os fungicidas têm modo de ação diferentes (ZAMBOLIM et al., 2007).

O conhecimento da resistência cruzada é importante no desenvolvimento de novos fungicidas e na definição de estratégias antiresistência. Se o fungicida em pesquisa apresentar estrutura química ou mecanismo de ação semelhante a outro que já apresenta problemas de resistência, provavelmente, ocorrerá resistência cruzada. Assim, é necessário avaliar a eficiência do novo produto sobre uma coleção de linhagens que apresentam resistência a fungicidas de grupos diferentes ou que tenham mecanismos de ação semelhantes (GHINI & KIMATI, 2000).

Com relação às medidas de controle, tendo como objetivo o controle químico da mancha-alvo da soja, trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos, mais em situações de campo, de maneira a comprovar, a eficácia de diferentes ingredientes ativos de fungicidas e momentos de aplicação (em relação ao ciclo de desenvolvimento da cultura).

Por outro lado, no que se refere a metodologias para o desenvolvimento de pesquisas em condições de laboratório ou em ambiente controlado, muitas informações necessitam ser geradas. Uma importante informação neste sentido refere-se à fungitoxicidade de substâncias para o fungo *C. cassiicola*, isolado da soja.

Valores de CI_{50} , para diferentes fungicidas e específicos a *C. cassiicola* em soja, são escassos na literatura, contudo úteis na condução de trabalhos de pesquisa e monitoramento de sensibilidade, principalmente em regiões onde o controle desta doença não está sendo eficiente.

2.9 Considerações sobre as dificuldades no manejo da mancha-alvo

Entre as principais dificuldades para o manejo da mancha-alvo poderia ser citado:

I – Falta da prática da rotação de culturas devido aos altos preços pagos aos grãos de soja;

II – Poucos cultivares resistentes a mancha-alvo. Os programas de melhoramento deveriam direcionar seus estudos para o desenvolvimento de cultivares com resistência;

III – Prática do plantio direto favorecendo a sobrevivência dos fungos necrotróficos na palha;

IV – A semente é uma das fontes de disseminação dos fungos necrotróficos. Têm-se dificuldades da erradicação (eliminação de 100%) dos patógenos que nela sobrevivem;

V – Deficiência no controle químico da mancha-alvo e dificuldade de deposição dos fungicidas na parte inferior do dossel. O fungo *C. cassiicola* reduziu ou perdeu a sensibilidade a fungicidas?

VI – Falta de opções de novos ingredientes ativos que sejam eficientes.

CAPÍTULO I

OCORRÊNCIA DE *Corynespora cassiicola* EM SOJA NAS SAFRAS 2009 E 2010

AVELINE AVOZANI¹

RESUMO – A mancha-alvo da soja, agente causal *Corynespora cassiicola*, é uma doença que vem causando prejuízos principalmente na região Centro-Oeste, onde ocorre com maior frequência e em caráter epidêmico. Em experimentos conduzidos no Laboratório de Fitopatologia/Micologia e em câmara de crescimento da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo quantificou-se a incidência de *C. cassiicola* em amostras de folíolos de soja enviados ao Laboratório. Foram analisadas 43 amostras, oriundas dos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia e São Paulo, no período de 2009 a 2010. Discos foliolares contendo lesões foram submetidos à câmara úmida por quatro dias com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Constatou-se a incidência de *C. cassiicola* em 38 amostras com média de 39% e frequência de 88%. Foram identificados os gêneros *Corynespora*, *Cercospora*, *Colletotrichum* e

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração Fitopatologia.

Fusarium nas amostras avaliadas, com predominância de *C. cassiicola*.

Palavras-chave: Mancha-alvo, *Glycine max*, incidência.

THE OCCURENCE OF *CORYNESPORA CASSICOLA* IN SOYBEAN IN THE 2009/2010 GROWING SEASONS

ABSTRACT - The soybean target leaf spot, caused by *Corynespora cassiicola*, is a disease that has been causing significant losses in the Midwest, where it occurs frequently and causing epidemics. In experiments conducted at the Laboratory of Plant Pathology and in a growth chamber at the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo the incidence of *C. cassiicola* in samples of soybean leaflets sent to the laboratory were quantified. Forty three samples from the states of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia and São Paulo in the period 2009 to 2010 were analysed. Leaflet discs containing lesions were kept in moist chamber for four days with a temperature of 25 ± 2 ° C and a photoperiod of 12 hours to stimulate frutification. The *C. cassiicola* presence was detected in 38 samples with an average of 39% and 88% frequency. The genera *Corynespora*, *Cercospora*, *Colletotrichum* and *Fusarium* were indentified in the tested samples with *C. cassiicola* predominance.

Key words: Target spot, *Glycine max*, incidence.

1 INTRODUÇÃO

Em vários países do mundo a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] destaca-se como uma das culturas mais importantes na produção de grãos. No Brasil, esta oleaginosa apresenta o maior crescimento em área cultivada, com um crescimento de 2,6%, ou seja, 611,0 mil hectares a mais que à da safra 2009/2010, quando foram cultivados 23,47 milhões de hectares. Estes resultados superam o recorde até então da safra 2004/05, com 23,3 milhões de hectares (CONAB, 2011).

Apesar da posição de destaque do Brasil no cenário mundial, o potencial de rendimento de grãos de soja tem sido limitado, principalmente, devido à ocorrência de doenças que atacam a cultura. Outras limitações devem-se, as condições ambientais desfavoráveis no decorrer do ciclo da cultura e o uso de práticas culturais inadequadas. Para minimizar esses efeitos deve-se realizar a rotação de culturas, a correção do solo, utilizar sementes certificadas, fazer o manejo adequado de plantas daninhas e insetos, utilizar cultivares resistentes e tecnologia para se obter eficiência na colheita (REUNIÃO, 2008; EMBRAPA, 2003).

Segundo Sinclair & Backman (1989), são listadas mais de 100 doenças afetando a cultura da soja, sendo que 47 foram descritas no Brasil (YORINORI, 1997).

Dentre algumas doenças de importância para a cultura, destaca-se a mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) (WEI, 1950). Esta doença ganhou importância devido à sua ocorrência em caráter epidêmico e danos causados nas

regiões que compreendem desde o Paraná (Sul do Brasil) até o Centro-Oeste ou cerrado brasileiro onde a soja é cultivada em larga escala.

As condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da doença é de temperaturas que variam de 22 a 30 °C Silva et al. (2008), umidade relativa do ar igual ou maior que 80%, sendo que o déficit hídrico inibe o crescimento do fungo (SINCLAIR & BACKMAN, 1989). Muliterno de Melo (2009) constatou que a temperatura de 23 °C é ótima para germinação dos conídios de *C. cassicola*.

Cultivares suscetíveis podem sofrer desfolha prematura, apodrecimento das vagens e manchas nas hastes. Através da infecção da vagem, o fungo atinge a semente, podendo ser disseminado para outras áreas. A infecção na região da sutura das vagens em desenvolvimento pode resultar em necrose, sua abertura e germinação ou apodrecimento dos grãos ainda verdes (EMBRAPA, 2003).

Segundo Silva et al. (2008) o melhoramento genético pode estar contribuindo para o aumento da incidência e severidade da mancha-alvo. Isso por que, normalmente os programas de melhoramento buscam resistência a nematóides, como o de cisto (*Heterodera glycine* Ichinohe) disseminado nos estados da região Centro-Oeste. Se por um caminho o melhoramento genético obtém sucesso no desenvolvimento das cultivares resistentes para nematóides, por outro, estas cultivares tornaram-se suscetíveis a *C. cassicola*.

Como o fungo apresenta uma ampla gama de hospedeiros, sobrevive saprofiticamente em raízes, hastes, sementes e em áreas de

pousio por dois anos ou mais, podendo permanecer em restos culturais de um grande número de espécies vegetais (SINCLAIR & BACKMAN, 1989). Desta forma, este patógeno poderá manter ou aumentar sua fonte de inóculo ao longo das safras, proporcionando incrementos na ocorrência ou severidade da doença.

O presente trabalho teve como objetivo quantificar a incidência de *C. cassicola* em amostras de soja de várias regiões brasileiras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folíolos de soja com sintomas da doença, oriundas das principais regiões produtoras de soja do Brasil, foram analisadas nos anos de 2009 e 2010, no Laboratório de Fitopatologia/Micologia da Universidade de Passo Fundo/UPF.

2.1 Identificação do agente causal

Após o registro das amostras, as folhas foram herbarizadas, identificadas e armazenadas em envelopes de papel, constituindo uma coleção de isolados de *Corynespora cassicola*. A partir dos folíolos recebidos, o patógeno foi isolado de discos foliolares de 9,0 mm de diâmetro, contendo porções necróticas e sadias do tecido que apresentavam os sintomas da doença. Realizou-se a assepsia do material através da imersão em álcool 99%, lavando-os em água destilada e, em seguida, transferidos para uma solução aquosa de hipoclorito de sódio 1% por três minutos. Posteriormente,

os discos foram lavados novamente com água destilada, para retirar o excesso de hipoclorito.

Após a desinfestação, foram distribuídos 25 discos em caixas de acrílico, tipo gerbox de poliestireno cristal (11 x 11 x 3,5 cm de altura), com tampa. No fundo do recipiente posicionou-se uma espuma de polietileno e duas folhas sobrepostas de papel filtro, recortadas com tamanho interno igual da caixa, que foram embebidas com água destilada, até a saturação da espuma, constituindo uma câmara úmida. O material foi acondicionado em câmara de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12 horas, em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência, localizadas a 50 cm acima dos gerboxes.

2.2 Avaliação

A avaliação foi realizada após quatro dias, em microscópio estereoscópico, avaliando-se a incidência de *C. cassiicola* e a presença de outros fungos. Para isso, dos 25 discos distribuídos em gerbox, contou-se quantos apresentavam as estruturas de *C. cassiicola*. Amorim (1995) descreve incidência como a porcentagem de plantas doentes ou partes de plantas doentes em uma amostra ou população, no caso desta metodologia os discos foliares. A frequência foi calculada pela contagem das amostras que apresentaram as estruturas de *C. cassiicola*.

2.3 Isolamento monospóricico

Após a esporulação do fungo no tecido vegetal, retirou-se, com o auxílio de uma agulha histológica flambada, conídios do patógeno, os quais foram transferidos para placas de petri contendo meio de cultura batata sacarose ágar (BSA), preparado segundo Fernandez (1993), obtendo assim os isolados de amostras de folíolos de soja.

O isolamento monospóricico do fungo foi realizado para cinco amostras oriundas dos Estados de Minas Gerais, de Mato Grosso do Sul e de Rondônia, recebidas no ano de 2009 (Tabela 1). Após o desenvolvimento da colônia, adicionou-se 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa, para a remoção dos conídios. Posteriormente, com o auxílio de um pincel de pelo de camelo número 20, foi realizada a remoção dos propágulos. Dessa suspensão foram pipetados 350 µL para cada placa de petri contendo o meio ágar-água (FERNANDEZ, 1993). Com o auxílio de uma alça de Drigalsky distribui-se a suspensão na superfície do meio de cultura e acondicionou-se em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, por 8 horas.

Tabela 1. Identificação dos isolados monospóricicos de *Corynespora cassiicola*

Isolado	Estado	Genótipo	Código
01	Minas Gerais	Linhagem	01/MG
05	Mato Grosso do Sul	Monsoy 8001	05/MS
19	Mato Grosso do Sul	Linhagem	19/MS
21	Mato Grosso do Sul	Monsoy 8336	21/MS
35	Rondônia	Linhagem	35/RO

Para a realização do isolamento monospórico, observou-se em microscópio óptico, aumento de 100 x, quanto à germinação dos conídios. Com o auxílio de uma agulha flambada, cortou-se pequenas porções do meio, contendo apenas um conídio germinado. Cada fragmento foi transferido para uma placa de petri contendo meio de cultura batata sacarose ágar (BSA). As placas foram incubadas em câmara climatizada, em ambiente controlado por 15 dias e após transferiu-se o fungo para tubos contendo meio BSA, armazenando-os em refrigerador a 5 °C (Micoteca do laboratório).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência de *C. cassiicola* nas amostras referentes aos dois anos de estudo variou de 9% a 82% (Tabela 2), apresentando uma média de 39% de incidência e frequência de 88%. Entre as amostras analisadas no ano de 2009, verificou-se a ocorrência de outro fungo identificado como *Cercospora* sp. Em inoculação deste patógeno em plantas de soja, estas não apresentaram sintomas, assim a sua presença poderia ser considerada como oportunista. Outros gêneros de fungos foram encontrados, entre eles *Colletotrichum* e *Fusarium*, porém, observou-se a predominância de *C. cassiicola*.

Tabela 2. Relação de populações de *Corynespora cassiicola*, incidência e frequência nas amostras recebidas nos anos de 2009/2010

Amostra/Data	Estado	Cultivar	Incidência (%)
01/09	MG	Linhagem	45
02/09	SP	Guairá	16
03/09	MS	V MAX RR	12
04/09	MS	CD 219 RR	38
05/09	MS	Monsoy 8001	76
06/09	MS	Monsoy 8336	48
07/09	MS	Monsoy 8336	52
08/09	MS	Engopa 316	32
09/09	MS	Monsoy 8336	46
10/09	MS	Monsoy 8336	50
11/09	MS	Monsoy 8336	42
12/09	MS	Favorita	30
13/09	MS	Linhagem	61
14/09	MG	P 98y11	36
15/09	MT	TMG 115	29
16/09	MT	TMG 132	38
17/09	MG	Valiosa	72
18/09	PR	Linhagem	-
19/09	MS	Linhagem	56
20/09	MS	Favorita	40
21/09	MS	Monsoy 8336	48
22/05	RR	BRS Tracajá	11
23/06	RR	BRS Tracajá	09
24/09	RS	Apolo	-
25/09	MT	Linhagem	32
26/09	PR	Linhagem	42
27/09	MT	TMG 803	16
28/09	MT	NK 7059 RR	21
29/09	MT	Linhagem	49
30/09	PR	CD 205	67
31/09	PR	Linhagem CD	45
32/09	SP	Linhagem CD	-
33/09	SP	CD 205	-
34/09	RS	CD 205	-
35/09	RO	Linhagem	56
36/10	MS	Várias cultivares	72

37/10	PR	Linhagem	68
38/10	PR	Linhagem	59
39/10	PR	Linhagem	18
40/10	MS	Linhagem	72
41/10	MS	Linhagem	61
42/10	MS	Linhagem	40
43/10	MT	Monsoy 8336	82
Incidência/Média			39
Frequência/Média			88

(-) Não se detectou *Corynespora cassiicola*.

Nas porções de tecidos foliares, sob microscópio estereoscópico observou-se a esporulação do fungo com a formação dos conidióforos e conídios. O fungo *C. cassiicola* pertence à classe dos *Deuteromycetos* que também é conhecida como fungos imperfeitos, devido à reprodução sexual ser ausente ou raramente ocorrer (KRUGNER & BACCHI, 1995). No caso de *C. cassiicola*, a reprodução sexual até o momento não é conhecida, podendo ocorrer ou ser ausente. Os conidióforos observados eram individuais e livres, sendo essa característica dos fungos pertencentes à subclasse *Hyphomycetidae* (KRUGNER & BACCHI, 1995). Os conidióforos eram de coloração escura e os conídios hialinos. Ellis (1971) descreveu os conídios de *C. cassiicola* como sendo de coloração sub-hialina a marron.

Informações sobre época de semeadura, número de aplicações, dose e produtos aplicados nas plantas em que se coletaram as amostras, foram repassadas por poucos e, portanto, não foram discutidas no presente trabalho.

Panique (2007) relatou que os danos com essa doença, na cultura da soja, podem chegar a 50%. Não somente em soja, mas em

outros patossistemas esta doença foi relatada causando sérios danos, como na cultura do pepino (TERAMOTO, 2008). Em lavouras comerciais e em cultivo protegido de tomate, observaram-se epidemias em vários Estados do Brasil, onde o patógeno atacou principalmente os frutos, causando prejuízos diretos aos produtores (REIS & BOITEUX, 2007). Em 2001, no município de Junqueirópolis, foi constatada a ocorrência da mancha-alvo em acerola, resultando em danos para os produtores (CELOTO, 2009).

Um dos fatores que vem contribuindo para o aumento da intensidade e dos danos dessa doença, na cultura da soja, na região dos cerrados, é o monocultivo da soja em plantio direto, em grandes áreas, somado às condições ambientais favoráveis e cultivares suscetíveis. O patógeno requer temperaturas entre 22 °C e 30 °C, com molhamento foliar prolongado (SILVA et al ., 2008). Umidade relativa do ar igual ou maior que 80% também favorecem o desenvolvimento da doença. Ao contrário, o déficit hídrico inibe o crescimento do fungo (SINCLAIR & BACKMAN, 1989).

Além disso, Silva et al. (2008) relatam que o aumento em caráter epidêmico da mancha-alvo pode ser explicado em função da busca de cultivares resistentes para o nematóide do cisto (*Heterodera glycines* Ichione), amplamente disseminado nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e na região do Triângulo Mineiro. Neste caso, a maioria dos cultivares resistentes ao nematóide do cisto tem apresentado suscetibilidade a *C. cassicola*. Com o aparecimento do nematóide do cisto da soja os programas de melhoramento rapidamente começaram a incorporar genes de resistência, sendo que a

maior parte dos genótipos gerados são oriundos de poucas fontes de resistência (Silva¹).

Carris & Glawe (1986), relataram que durante um estudo sobre nematóide do cisto da soja, um número expressivo de gêneros de fungos fitopatogênicos foram encontrados, entre eles *C. cassiicola* que foi isolado do cisto de *H. glycines* no solo. A capacidade de se desenvolver nas raízes de soja possibilita o crescimento do fungo em raízes no desenvolvimento de cistos. O isolamento a partir de cistos de *H. glycines* indica que *C. cassiicola* apresenta pouca especificidade em relação ao substrato. Além disso, os cistos podem oferecer uma alternativa pelo qual o fungo sobreviva na ausência de plantas hospedeiras. Um cisto do nematóide pode sobreviver no solo por vários anos. Porém, mais estudos são necessários para determinar se os cistos servem, realmente, como uma importante fonte de inóculo do patógeno.

Aparentemente, a maior parte dos cultivares de soja resistentes ao nematóide do cisto apresenta maior suscetibilidade a mancha-alvo e provavelmente este fato esteja ligado a base genética estreita, e que a seleção visando a resistência a mancha-alvo não está sendo realizada na fase inicial dos programas de melhoramento (SILVA¹, informação verbal).

Como o plantio de cultivares resistentes representa uma das melhores alternativas de manejo integrado, é importante que os programas de melhoramento genético elejam a resistência a mancha-alvo com uma de suas prioridades (SILVA et al ., 2008).

¹ SILVA, J. F. V. (Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa) - 2010.

4 CONCLUSÕES

O fungo *Corynespora cassicola* predomina nas amostras recebidas nos dois anos de estudo e *Cercospora* sp no ano de 2009.

Pela dificuldade de obtenção dos sintomas nas plantas e produção de conídios em meios artificiais, *Cercospora* sp. não foi identificada, podendo ser possivelmente considerada como uma espécie oportunista.

Recomenda-se a realização de estudos de identificação, patogenicidade e ocorrência dessa espécie.

Os gêneros *Cercospora*, *Colletotrichum* e *Fusarium* são encontrados nas amostras analisadas, porém com predominância de *Corynespora* com 39% de incidência.

CAPÍTULO II

PATOGENICIDADE DE CINCO ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* EM SOJA

AVELINE AVOZANI¹

RESUMO – A mancha-alvo da soja, tem como agente causal o fungo *Corynespora cassiicola* que pode causar danos de até 50%. O fungo pode atacar as raízes, as hastes, as vagens e principalmente as folhas das plantas. Este trabalho objetivou testar a patogenicidade de cinco isolados de *C. cassiicola* obtidos de folhas de soja, enviadas ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Passo Fundo/RS, no ano de 2009. Na mensuração de 100 conídios, a partir do isolamento monospórico, estes apresentaram valores de comprimento, largura e número de pseudoceptos semelhante ao gênero *Corynespora*. Foi realizado os postulados de Koch para comprovar a patogenicidade. Em comparação com os sintomas produzidos, com as descrições na literatura, confirmou-se a patogenicidade à soja, dos cinco isolados de *C. cassiicola* utilizados neste trabalho.

Palavras-chave: Mancha-alvo, postulado de Koch, *Glycine max*.

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração Fitopatologia.

**PATHOGENICITY OF FIVE ISOLATES OF *Corynespora*
cassiicola TO SOYBEAN**

ABSTRACT – The soybean target leaf spot, caused by the fungus *Corynespora cassiicola* can result in damage up to 50%. The fungus can attack the roots, stems, pods and especially the leaves. This study aimed to test the pathogenicity of five *C. cassiicola* isolates, obtained from soybean leaves, sent to the Laboratory of Plant Pathology, University of Passo Fundo / RS, in 2009 growing season. In the measurement of 100 conidia, from monosporic isolations, values of length, width and number pseudoseta were similar to the genus *Corynespora*. Kochs's postulates to prove pathogenicity was carried out. Comparing the produced symptoms with literature descriptions, confirmed the pathogenicity to soybean by the five isolates of *C. cassiicola* used in this work.

Key words: Target spot, Koch's postulates, *Glycine max*.

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], é uma espécie originária do sudoeste asiático, sendo cultivada a centenas de anos. Devido a sua adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas seu cultivo se expandiu por todo o mundo, constituindo-se uma das principais plantas cultivadas atualmente. Seu rendimento potencial dificilmente é alcançado e dentre os principais fatores que limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção da soja destacam-se as doenças (JULIATI et al., 2004)

O fungo, *Corynespora cassiicola* (Berk & M. A. Curtis) Wei (1950), pode atacar as raízes, as hastes, as vagens e principalmente as folhas baixas das plantas, onde causa a redução da área fotossintética em função das lesões foliares e, principalmente, pela desfolha precoce das folhas (SINCLAIR & BACKMAN, 1989; SILVA et al., 2008).

Nas folhas, as manchas são de formato arredondado ou irregular, com coloração castanha avermelhada e quando completamente desenvolvidas podem apresentar anéis concêntricos, semelhantes a um alvo, podendo chegar 15 mm de diâmetro. Nas vagens e hastes as lesões são irregulares com coloração marrom escuro. Em alguns casos, o fungo penetra na vagem e produz pequenas lesões, marrom escura nas sementes (SINCLAIR & BACKMAN, 1989; ALMEIDA et al., 1997).

Os sintomas da podridão de raiz são de fácil reconhecimento nas plantas mortas e em solo úmido, devido a abundante esporulação do fungo. Isolados de *C. cassiicola* obtidos de

infecções radiculares podem causar manchas foliares, porém, estudos mais detalhados são necessários para confirmar se a espécie que causa a mancha foliar e a podridão de raiz são as mesmas (YORINORI, 1998).

O patógeno apresenta conidióforos eretos, ramificados, de coloração pálida a marrom, com até vinte septos medindo 110-850 μm Ellis (1971) ou 44-350 μm de comprimento Hartman et al. (1999) por 4-11 μm de largura.

Os conídios podem ser isolados ou em cadeia de dois a seis com coloração parda, dilatados na base, retos ou ligeiramente curvados, com 4 a 20 pseudoseptos, medindo de 40-220 μm de comprimento (em meio de cultura pode chegar a 520 μm) x 9-22 μm de espessura (ELLIS, 1971).

Hartman et al. (1999) descrevem que o patógeno apresenta estruturas de repouso, os clamidósporos, que são intercalares ou terminais, hialinos, podendo ser encontrados em colônias envelhecidas.

O fungo pode ser isolado de sementes, raízes, hastes, folhas e vagens que estejam contaminadas com o patógeno e já foi relatado ocasionando problemas em vários patossistemas.

Em tomateiro, Reis & Boiteux (2007), relataram que o patógeno atacou principalmente os frutos, tanto os verdes como aqueles no ponto de colheita. No cultivo da acerola Celoto (2009) relatou que apenas as folhas são afetadas pelo patógeno, causando sérios prejuízos.

Isolados obtidos do tomateiro, foram patogênicos em várias espécies vegetais. Isto implica que para reduzir o inóculo

inicial, as plantas utilizadas em sistema de rotação de cultura não devem ser hospedeiras para este patógeno (CUTRIM & SILVA, 2003).

Em cultivares de soja suscetíveis, através da infecção da vagem, o patógeno atinge a semente (BOTTA, 1989), podendo ser disseminado para outras áreas. A infecção na sutura das vagens em desenvolvimento pode resultar em necrose, sua abertura e germinação ou apodrecimento dos grãos ainda verdes (EMBRAPA, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo confirmar a patogenicidade de cinco isolados de *C. cassiicola*, como agente causal da mancha-alvo da soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia/Micologia e em casa-de-vegetação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo/UPF.

A partir da obtenção dos isolados monospóricos, realizou-se a prova de patogenicidade para os cinco isolados (Tabela 1), através da inoculação em plantas de soja da cultivar BMX Potência, considerada suscetível a mancha-alvo.

Tabela 1. Identificação dos isolados monospóricos de *Corynespora cassiicola*

Isolado	Estado	Genótipo	Código
01	Minas Gerais	Linhagem	01/MG
05	Mato Grosso do Sul	Monsoy 8001	05/MS
19	Mato Grosso do Sul	Linhagem	19/MS
21	Mato Grosso do Sul	Monsoy 8336	21/MS
35	Rondônia	Linhagem	35/RO

2.1 Cultivo das plantas

As plantas foram cultivadas em vasos plásticos contendo 1 Kg de solo suplementado com cama de aviário. As sementes foram tratadas com Maxim XL na dose de 100 mL/100 Kg de sementes e semeadas na quantidade de 10 por vaso. Após a emergência, realizou-se a eliminação de algumas plântulas, mantendo-se de três a quatro plântulas por recipiente. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12 horas. O fertilizante composto Kristalon, foi aplicado no vaso, na dose de 100 g/5 L de água, quando a soja encontrava-se no estágio fenológico V₂ – primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida (EMBRAPA, 2010).

2.2 Multiplicação do inóculo

Para se obter uma concentração desejada de esporos para a inoculação, procedeu-se a multiplicação do inóculo. Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, pequenas porções da colônia de cada isolado de *C. cassiicola*, preservada em tubos de ensaio, foram

transferidas para placas de petri contendo o meio de cultura batata sacarose ágar (BSA) preparado segundo Fernandez (1993). Em seguida, as placas foram vedadas com papel filme e levadas até a câmara climatizada, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, por um período de 15 dias, até obter-se esporulação abundante.

De acordo com Almeida & Yamashita (1978) a melhor concentração da suspensão para a inoculação das plantas com o fungo *C. cassicola* é 5×10^4 conídios/mL.

2.3 Inoculação em plantas de soja

A inoculação dos cinco isolados foi feita no momento em que as plantas atingiram o estágio fenológico V₄ (quarto nó, terceira folha trifoliolada aberta) (EMBRAPA, 2010). A densidade de inóculo foi de 5×10^4 esporos/mL de água destilada. Com o auxílio de um micropipetador, ajustado para 0,01 mL foi feita a contagem de três gotas em microscópio óptico, ajustando a concentração para 5×10^4 conídios/mL.

Para melhorar a distribuição e molhamento das folhas com da suspensão do inóculo, foi adicionado duas gotas de espalhante adesivo Energic para cada 2 litros de água destilada.

A inoculação foi realizada através de atomização da suspensão do inóculo nas folhas de soja, em quatro vasos (20 mL/vaso). A concentração final foi ajustada, sendo o volume final da suspensão o mesmo para todos os isolados. Para o tratamento controle (testemunha), a atomização foi apenas de água mais o espalhante adesivo, com quatro repetições.

Após a inoculação, as plantas permaneceram em casa-de-vegetação, cobertas por um saco plástico transparente por 48 horas, e molhamento com aspersão por um minuto em intervalos de quatro horas, fornecendo ambiente favorável a infecção.

Após o aparecimento dos primeiros sintomas foi mantido o molhamento das plantas por aspersão, somente à noite. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de 23 °C e fotoperíodo de 12 horas.

2.4 Mensuração dos conídios

A mensuração dos conídios foi realizada após a montagem de lâminas individuais dos cinco isolados do fungo. Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, retirou-se pequenas porções da colônia com quinze dias de crescimento e depositou-se sobre a lâmina, adicionando uma gota de corante azul de algodão e sobre estes uma lamínula. Quatro repetições foram realizadas por isolado, fazendo-se a leitura de 25 conídios por lâmina, em microscópio óptico, aumento de 400 x.

2.5 Avaliação da doença

Decorridas duas semanas, realizou-se a avaliação do número de lesões/folha e a mensuração das lesões, com auxílio de um paquímetro digital. Considerou-se apenas as lesões com diâmetro maior ou igual a 2 mm.

2.6 Reisolamento do fungo de folhas de soja com sintomas da mancha-alvo

Para completar o teste de patogenicidade realizou-se o reisolamento de folhas inoculadas através da incubação, em gerbox, de discos das folhas, os quais também foram mantidos em meio de cultura BSA. Para isso, realizou-se a desinfestação dos fragmentos de tecido vegetal em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos. Após foram lavados com água destilada para remover o excesso do desinfetante. Em seguida, os discos foram distribuídos em caixas de acrílico, tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo uma espuma de nylon e duas folhas sobrepostas de papel filtro, umedecidos com água destilada e esterilizada e mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12 horas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições ideais para o desenvolvimento da doença em casa-de-vegetação somente foram obtidas quando se adotou um conjunto de medidas como: uso de cultivar suscetível, ambiente com temperatura entre 21 a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, inoculação por aspersão, densidade de inóculo de 5×10^4 esporos/mL, umidade relativa saturada 48 horas após a inoculação e molhamento por aspersão após o aparecimento dos primeiros sintomas.

Essas condições são citadas por Almeida & Yamashita (1978), que descrevem que o período ideal de incubação de *C. cassicola* para a infecção foi alcançado quando se manteve as plantas cobertas por um saco plástico por 48 horas com umidade relativa saturada. Ao contrário, quando se diminuiu esse período para 12 a 24 horas de incubação, a infecção obtida foi reduzida e quando aumentou este para 72 horas, ocorreu amarelecimento e queda prematura das folhas. Sinclair & Backman (1989) descrevem, que para ocorrer à infecção na folha, a umidade relativa do ar deve ser igual ou maior que 80%, sendo que a falta de umidade inibe o crescimento do fungo.

Almeida & Yamashita (1978) relatam que os sintomas apareceram mais rapidamente e foram de fácil reconhecimento quando se efetuou a inoculação por aspersão das folhas com suspensão de esporos. A concentração de 5×10^4 esporos/mL foi a que apresentou melhores resultados, e quando se inoculou uma concentração maior, de 10×10^4 esporos/mL, resultou em coalescência de lesões, dificultando a avaliação dos sintomas.

Em trabalho similar, Muliterno de Melo (2009) relata que a intensidade da doença, na cultivar CD 219 RR, foi maior com o aumento da concentração de esporos. A maior concentração usada foi de 45×10^3 e resultou na maior intensidade da doença, porém a menor, 5×10^3 , não diferiu estatisticamente da testemunha.

Os sintomas da doença iniciaram por pequenas pontuações de coloração parda, com halo amarelado. Com a evolução da doença, estes pontos evoluíram para manchas de formato arredondado ou irregular, de coloração castanho avermelhado

variando em tamanho de 2,03 a 14,74 mm (Tabela 2). As manchas apresentaram anéis concêntricos semelhantes a um alvo (Figura 1).



Figura 1. Sintomas da mancha foliar causada por *Corynespora cassicola* com anéis concêntricos semelhantes a um alvo (Avozani & Reis, 2010).

As avaliações do número de lesões/folha foram realizadas pela coleta de trifólios, em função do maior número de lesões. O número de lesão/folha variou entre 9,07 a 13,94 (Tabela 2), considerou-se lesão aquela que apresentou diâmetro maior ou igual a 2 mm.

Nas vagens e hastes as lesões foram irregulares de coloração castanhas avermelhada a escuras e levemente deprimidas. Esses sintomas assemelham-se com os descritos por Almeida et al. (2005) e Sinclair & Backman (1989).

Em estudos sobre a variabilidade de isolados de *C. cassicola*, Spencer & Walters (1969) verificaram pequenas lesões vermelhas a marrom avermelhada, com halos amarelos brilhantes. As

manchas que cresceram por mais que 3 mm de diâmetro se mostraram semelhantes a um alvo. As folhas trifolioladas foram severamente infectadas devido ao grande número de lesões. Ocorreu avermelhamento nas nervuras, em ambas as superfícies da folha, e porções terminais de algumas plantas morreram.

O maior diâmetro de lesão encontrado foi de 14,74 mm (Tabela 2). Este valor é semelhante ao descrito por Hartman et al. (1999), que relatam que o diâmetro das manchas foliares mais antigas podem variar de 10 a 15 mm. As plantas pulverizadas apenas com água e com o espalhante adesivo Energic não apresentaram sintomas.

Tabela 2. Número de lesões/folíolo e diâmetro das lesões de cinco isolados monospóricos de *Corynespora cassicola* em folíolos de soja

Isolado	Lesões/folíolo (n^o)	Diâmetro das lesões /médias
01/MG	10,74	2,08 - 9,30 (4,34)
05/MS	13,94	2,08 - 10,10 (4,19)
19/MS	12,59	2,19 - 10,00 (4,82)
21/MS	12,12	2,03 - 14,74 (4,28)
35/RO	9,07	2,07 - 9,30 (4,81)
Média (mm)	11,69	2,09 – 10,69 (4,49)

* os valores entre parênteses representam as médias.

Cutrim & Silva (2003) testaram a patogenicidade de dois isolados obtidos de tomateiro, em várias espécies vegetais, entre elas soja e duas plantas daninhas, trapoeraba (*Commelina benghalensis* L. -jio) e assa peixe (*Vernonia cinérea* L.). As plantas reagiram

diferentemente ao patógeno, sendo a maioria suscetível aos dois isolados de tomateiro.

Em estudos da patogenicidade em quatro híbridos de pepino, Oliveira et al. (2006) testaram isolados de *C. cassiicola* obtidos de diferentes espécies hospedeiras, verificando que três isolados originários de pepino e um de abóbora foram capazes de infectar os quatro híbridos, sendo que dois híbridos foram infectados por dois isolados obtidos de soja e um do tomateiro.

Os resultados de inoculação confirmam a patogenicidade de *C. cassiicola* em soja quantificados pelo número e tamanho das lesões/folha e a mensuração de 100 conídios de *C. cassiicola*, quanto ao comprimento, largura e número de pseudoseptos, a partir do isolamento monospórico em meio BSA. Os valores da mensuração dos conídios constam na Tabela 3.

Tabela 3. Menor, maior e médias do comprimento, largura e número de pseudoseptos de esporos de cinco isolados monospóricos de *Corynespora cassiicola*

Isolado	Comprimento μm	Largura	Pseudoseptos (n°)
01/MG	40 - 150 (79)*	5 - 10 (7)*	2 - 14 (6)*
05/MS	53 - 140 (79)	5 - 10 (7)	3 - 12 (7)
19/MS	43 - 130 (66)	5 - 10 (6)	2 - 12 (6)
21/MS	43 - 115 (69)	5 - 10 (7)	2 - 10 (6)
35/RO	38 - 173 (77)	5 - 10 (7)	2 - 17 (7)
Média	39,4 - 141,6 (74)	5 - 10 (6,8)	2,2 - 13 (6,4)

* os valores entre parênteses representam as médias.

A morfologia dos conídios de *C. cassiicola* foi semelhante à descrita por Hartman et al. (1999), 39-520 µm de comprimento x 7-22 µm de espessura. Muliterno de Melo (2009) na mensuração de 200 conídios isolados no meio BDA encontrou 69–179 x 8-10 µm, média de 124 x 9 µm. Pode-se observar que, quanto ao comprimento do maior conídio e a espessura destes, estas medidas possui um limite inferior menor do que descrito na literatura, mas dentro da média citada pelos autores.

Os conídios obsevidos em microscópio óptico aumento de 400 x, apresentaram formato semelhante ao descrito por Ellis (1971), isto é, formação em cadeia de dois a seis, hialinos, dilatados na base, retos ou ligeiramente curvados.

Quanto à etiologia de *C. cassiicola* Viegas (1979) descreve *Corynespora* (coryne = massa clavada + spora = esporo), ou seja, “esporo clavado”. Quanto a espécie *cassiicola* Wei (1950), relata que o fungo foi isolado de planta do gênero *Cassia* sp., em 1869, por Charles Wright. A terminação *icola* significa viver ou se desenvolver (ULLOA & HANLIN, 2000). Portanto, a palavra *cassiicola* significa “viver em cássia”.

Nos reisolamentos realizados a partir dos fragmentos de tecido infectado foram obtidas culturas da espécie *Corynespora*, com crescimento miceliano e esporulação abundante. O micélio cresceu de forma uniforme em todas as direções, com as colônias produzindo anéis de crescimento concêntricos. Inicialmente o micélio é branco e floculento, tornando-se mais tarde cinza escuro e constituindo de um emaranhado preto oliváceo. Essas características se assemelham as descritas por Sinclair & Backman (1989) e Ellis (1971). A morfologia

das colônias, em alguns momentos apresentou variações quanto à coloração, adquirindo uma coloração mais avermelhada, em virtude desta característica a esporulação foi reduzida.

O isolado 35/RO apresentou diferença na morfologia da colônia, em relação aos outros isolados, sendo a colônia cinza e seu micélio mais aéreo e com um aspecto “algodonoso”.

4 CONCLUSÕES

Pela observação dos postulados de Koch confirma-se a espécie e a patogenicidade de *Corynespora cassicola*, pela caracterização morfológica e pela comparação com descrições da espécie, disponíveis na literatura.

Os cinco isolados avaliados das amostras originárias dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Rondônia, são patogênicos a soja.

CAPÍTULO III

SENSIBILIDADE MICELIANA DE *Corynespora cassiicola*, ISOLADO DA SOJA, A FUNGICIDAS TRIAZÓIS E BENZIMIDAZÓIS, *IN VITRO*

AVELINE AVOZANI¹

RESUMO – A mancha-alvo da soja, causada por *Corynespora cassiicola* é controlada principalmente pela aplicação foliar de fungicidas do grupo dos benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas. Na região Centro-Oeste nas últimas safras verificou-se a baixa eficiência do controle da doença. Levantou-se a hipótese de que poderia ser devido à redução ou perda da sensibilidade do fungo aos fungicidas. Para esclarecer o fato, experimentos foram realizados para determinar a sensibilidade miceliana, *in vitro*, de cinco isolados de *C. cassiicola* a fungicidas. A avaliação do crescimento miceliano foi realizada colocando-se discos de micélio dos isolados em placas de petri contendo substrato suplementado com concentrações de 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 20 e 40 mg/L para os ingredientes ativos carbendazim, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol e tebuconazol. Os resultados da porcentagem de inibição do crescimento miceliano foram submetidos à análise de regressão, logarítmica e calculada a concentração que inibe 50% do crescimento miceliano (CI₅₀). O experimento foi

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração Fitopatologia.

conduzido e repetido por duas vezes em ambiente controlado, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, com quatro repetições. As médias entre as duas repetições dos experimentos mostram variações quanto à sensibilidade entre os isolados. A perda da sensibilidade foi observada apenas para o ingrediente ativo carbendazim, para três isolados. Para os princípios ativos tebuconazol e epoxiconazol a CI_{50} ficou entre 1,89 e 2,91 mg/L, e para o ciproconazol variou de 9,21 a 20,32 mg/L para os cinco isolados. A CI_{50} para o fungicida flutriafol variou de 0,77 a 2,18 mg/L. Os valores de CI_{50} , gerados nesse trabalho, podem ser utilizados como padrão de referência para o monitoramento da sensibilidade do fungo.

Palavras-chaves: Sensibilidade, benzimidazóis, triazóis, mancha-alvo, *Glycine max*.

***IN VITRO* MYCELIAL SENSITIVITY OF *Corynespora cassiicola*, ISOLATED FROM SOYBEAN, TO BENZIMIDAZOLE AND TRIAZOLE FUNGICIDES**

ABSTRACT – The soybean target leaf spot caused by *Corynespora cassiicola* is mainly controlled by foliar application of benzimidazole, triazole and strobilurin fungicides. In the last growing seasons in the Midwest region there was noticed low efficiency of disease chemical control. This fact raised the hypothesis that it could be due to reduced or loss of the fungus sensitivity to fungicides. To clarify the statement, *in vitro*, experiments to determine the sensitivity of mycelium of five isolates of *C. cassiicola* to fungicides were conducted. The mycelial

growth evaluation was performed by placing mycelial disks of each isolate in petri dishes supplemented with fungicides concentrations of 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 20 and 40 mg/L for the active ingredient carbendazim, cyproconazole, epoxiconazole, flutriafol and tebuconazole. The inhibition percentage data of mycelial growth were submitted to logarithmic regression analysis and the concentration that inhibits 50% of mycelium growth (IC_{50}) was calculated. The experiments were conducted twice in a controlled environment, temperature 25 ± 2 ° C and a photoperiod of 12 hours, with four replications. The two experiments means showed variation for the fungus strains sensitivity. The loss of sensitivity was observed only for carbendazim and for three strains. For the active ingredients tebuconazole, epoxiconazol the IC_{50} were in the range of 1,89 to 2,91 mg/L, and for cyproconazole from 9,21 to 20,32 mg/L for the five isolates. The IC_{50} for the fungicide flutriafol ranged from 0,77 to 2,18 mg/L. The IC_{50} values generated in this work may be used as a patterns for monitoring the sensitivity of the fungus.

Key words: Sensitivity, benzimidazole, triazoles, target spot, *Glycine max*.

1 INTRODUÇÃO

As doenças de plantas representam um dos fatores de maior risco para a agricultura, comprometendo a produção em muitas culturas, causando em escala mundial prejuízos para produtores e consumidores. Entre os patógenos que causam doenças, nas diversas culturas, os fungos são responsáveis com 81,5% do total (POZZA et al., 1999).

Em soja, *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curtis) Wei (1950), agente causal da mancha-alvo, tem preocupado produtores e pesquisadores, devido à ocorrência generalizada, severidade elevada e danos que pode causar à cultura se não for devidamente controlada.

A mancha-alvo é favorecida pelo plantio de cultivares suscetíveis, monocultura, plantio direto e com chuvas frequentes na fase vegetativa. Um fato que causa preocupação é a falta de opções de controle com fungicidas, uma vez que os benzimidazóis que eram recomendados para seu controle, apresentaram-se menos eficientes para o fungo nas últimas safras em variedades suscetíveis (EMBRAPA, 2010).

De acordo com as informações obtidas com técnicos e pesquisadores, da região Centro-Oeste, tem se questionado a eficiência do controle da mancha-alvo. Mesmo com várias aplicações de fungicidas, o controle não está sendo satisfatório. A hipótese seria do surgimento de linhagens do fungo com redução ou perda da sensibilidade a esses ingrediente ativos, devido à grande variabilidade do patógeno.

Reis et al. (2010) descrevem que a redução da sensibilidade envolve uma propriedade fundamental dos organismos, a habilidade de adaptação a diferentes condições de ambiente para sobreviver. O frequente uso de compostos químicos constitui em uma mudança de ambiente para o fungo, que antes era sensível a uma determinada substância torna-se insensível após a sua adaptação a esta nova situação.

A sensibilidade de um fungo a uma determinada substância tóxica é quantificada pela DE (dose efetiva), ou CE (concentração efetiva), ou CI (concentração inibitória). A CI_{50} se refere à concentração da substância que inibe 50% do crescimento miceliano ou da germinação de esporos potencialmente viáveis (REIS et al., 2010).

Valores de CI_{50} , para diferentes fungicidas e específicos a *C. cassiicola* em soja, são escassos na literatura, contudo muito úteis na condução de trabalhos de pesquisa e monitoramento de sensibilidade, principalmente em regiões onde o controle desta doença não esta sendo eficiente.

São poucos os trabalhos na literatura que comprovem a eficácia do controle químico desse patógeno na cultura da soja. Existem divergências de opiniões entre os pesquisadores e estas podem ser explicadas devido às diferenças entre as populações do patógeno de cada região (SILVA et al., 2008).

Com o objetivo de determinar, *in vitro*, a sensibilidade miceliana de isolados de *C. cassiicola* a fungicidas e gerar valores de CI_{50} para diferentes fungicidas utilizados para o controle da mancha-alvo da soja no Brasil, experimentos foram conduzidos no Laboratório

de Fitopatologia/Micologia, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo/UPF, nos anos de 2009 e 2010.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação do crescimento miceliano quanto à sensibilidade de isolados de *C. cassicola*, utilizou-se quatro fungicidas pertencentes ao grupo químico triazol, sendo eles: ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol e tebuconazol e um fungicida do grupo químico benzimidazol, o carbendazim (Tabela 1), testados para cinco isolados do fungo.

Tabela 1. Fungicidas utilizados para determinar a sensibilidade, *in vitro*, de cinco isolados monospóricos de *Corynespora cassicola* em soja

Produto técnico	Formulação comercial	Ingrediente ativo (g/L)	Grupo químico
Epoxiconazol	Opus SC	125 g/L	Triazol
Ciproconazol	Alto 100	100 g/L	Triazol
Carbendazim	Derosal 500 SC	500 g/L	Benzimidazol
Tebuconazol	Folicur 200 EC	200 g/L	Triazol
Flutriafol	Impact 125 SC	125 g/L	Triazol

2.1 Efeito *in vitro* de fungicidas sobre o crescimento miceliano de *Corynespora cassiicola*

Os isolados testados, neste experimento, oriundos dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Rondônia foram obtidos de folhas de soja, com os sintomas da doença, realizando o isolamento monospórico para os cinco isolados (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos isolados monospóricos de *Corynespora cassiicola*

Isolado	Estado	Genótipo	Código
01	Minas Gerais	Linhagem	01/MG
05	Mato Grosso do Sul	Monsoy 8001	05/MS
19	Mato Grosso do Sul	Linhagem	19/MS
21	Mato Grosso do Sul	Monsoy 8336	21/MS
35	Rondônia	Linhagem	35/RO

Sete concentrações dos fungicidas foram utilizadas nos ensaios: 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 20 e 40 mg/L de ingrediente ativo de cada fungicida diluído em água. A concentração 0 mg/L representou a testemunha do experimento, sem adição de fungicida.

As concentrações foram preparadas em erlenmeyer, adicionando-se os volumes necessários ao meio de cultura PDA pronto/39 g/L (Potato Dextrose Ágar – Marca Merk) requeridos para cada concentração. Após a esterilização do material em autoclave, em câmara climatizada, prepararam-se as soluções estoques em balões volumétricos contendo água mais a solução fungicida, resultando em um volume final de 100 mL. Após o preparo das soluções acrescentou-se os volumes necessários ao meio de cultura para que as

concentrações desejadas fossem satisfeitas. Os frascos foram cuidadosamente agitados e vertidos em placas de petri (90 x 15 mm) esterilizadas.

No dia seguinte ao preparo dos meios de cultura, discos de micélio de cada isolado de *C. cassicola*, com 6 mm de diâmetro, retirados de colônias com sete dias de crescimento, foram colocados no centro de cada placa de petri contendo substrato suplementado com as concentrações do fungicida testado. As placas foram vedadas com papel filme de PVC e incubadas na câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, proporcionado por três lâmpadas fluorescentes, 40 W, posicionados a 50 cm acima das placas.

2.2 Avaliação

A avaliação foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital, medindo o diâmetro das colônias, quando o crescimento do fungo no tratamento testemunha chegou à borda da placa.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de sete tratamentos e quatro repetições, cada um constituído por uma placa de petri.

Os experimentos foram repetidos duas vezes para garantir a precisão dos dados, utilizando na análise estatística a média dos dois experimentos.

Os resultados da mensuração do diâmetro das colônias do fungo foram transformados para porcentagem. O diâmetro do disco do fungo de 6 mm colocado no centro da placa representou 7,34 %.

Os dados foram submetidos à análise estatística, fungicida x isolado, onde calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento miceliano (PIC) de *C. cassicola* para cada tratamento em relação à testemunha e realizou-se a análise de regressão, logarítmica, utilizando o programa estatístico Costat e o Microsoft Excel. A concentração inibitória (CI_{50}) capaz de inibir 50% do crescimento miceliano do fungo para os fungicidas testados e para cada isolado de *C. cassicola* foi calculada a partir da equação gerada.

Para a classificação dos isolados quanto a sensibilidade para os fungicidas, utilizou-se o critério proposto por Edgington et al. (1971): insensíveis se a $CI_{50} > 50$ mg/L; moderadamente sensíveis se a CI_{50} estiver entre 1 e 50 mg/L e altamente sensíveis se a $CI_{50} < 1$ mg/L.

A redução da sensibilidade (RS) de uma linhagem de um fungo pode ser medida pelo fator de sensibilidade (FS), sendo calculado pela divisão entre a CI_{50} da linhagem suspeita de ter a sensibilidade alterada pela CI_{50} da sensível. Se o fator de sensibilidade (FS) for 1, a sensibilidade está sem alteração e sendo maior que 1 indica que está havendo redução na sensibilidade (RS). A RS é comprovada em laboratório e quando há aumento no fator de redução da sensibilidade (FRS), a linhagem do fungo reduziu a sensibilidade ao fungicida (REIS et al., 2010). Como, neste trabalho todos os isolados eram procedentes de regiões com a hipótese de falha de controle, para calcular o FRS foi utilizado a CI_{50} do isolado suspeito

dividido pelo menor valor encontrado da CI_{50} (isolado sensível/selvagem), para cada grupo químico (benzimidazol e triazol).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fungitoxicidade dos diferentes fungicidas, para a média das duas repetições do experimento, visando o crescimento miceliano, encontra-se representada nas Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7. Nenhum tratamento inibiu 100% o crescimento miceliano do fungo, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L (Figuras dos apêndices 1, 2, 3, 4 e 5).

Tabela 3. Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassicola* para o fungicida carbendazim

Isolado	Equação *	R^2	CI_{50} *	p	FRS
01/MG	$Y = -10,34 \ln(x) + 33,26$	84,54	0,20	< 0,01	1,00
05/MS	$Y = -0,45 \ln(x) + 92,70$	83,64	> 40	0,04	>200,00
19/MS	$Y = -0,76 \ln(x) + 87,74$	82,79	> 40	n.s.	>200,00
21/MS	$Y = -0,16 \ln(x) + 90,01$	15,64	> 40	n.s.	>200,00
35/RO	$Y = -10,82 \ln(x) + 35,32$	87,94	0,26	< 0,01	1,30

* y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida

** Concentração calculada pela equação (mg/L).

Tabela 4. Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassicola* para o fungicida ciproconazol

Isolado	Equação*	R^2	CI_{50}^{**}	p	FRS
01/MG	$y = -8,11 \ln(x) + 72,99$	85,83	15,26	< 0,01	19,88
05/MS	$y = -6,92 \ln(x) + 69,46$	87,09	16,65	< 0,01	21,62
19/MS	$y = -8,12 \ln(x) + 68,03$	92,32	9,21	< 0,01	11,96
21/MS	$y = -7,17 \ln(x) + 67,95$	89,11	12,23	< 0,01	15,88
35/RO	$y = -6,77 \ln(x) + 70,39$	83,20	20,32	< 0,01	26,39

* y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida

** Concentração calculada pela equação (mg/L).

Tabela 5. Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassicola* para o fungicida tebuconazol

Isolado	Equação*	R^2	CI_{50}^{**}	p	FRS
01/MG	$Y = -10,37 \ln(x) + 58,24$	93,09	2,21	< 0,01	2,87
05/MS	$Y = -9,49 \ln(x) + 59,78$	93,03	2,80	< 0,01	3,64
19/MS	$Y = -9,79 \ln(x) + 57,79$	95,99	2,22	< 0,01	2,88
21/MS	$Y = -10,8 \ln(x) + 56,89$	95,24	1,89	< 0,01	2,45
35/RO	$Y = -10,76 \ln(x) + 57,85$	93,85	2,07	< 0,01	2,69

* y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida

** Concentração calculada pela equação (mg/L).

Tabela 6. Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassicola* para o fungicida flutriafol

Isolado	Equação*	R^2	CI_{50}^{**}	p	FRS
01/MG	$y = -12,84 \ln(x) + 58,17$	86,87	1,89	< 0,01	2,45
05/MS	$y = -10,68 \ln(x) + 47,19$	90,20	0,77	< 0,01	1,00
19/MS	$y = -10,98 \ln(x) + 52,55$	89,70	1,26	< 0,01	1,64
21/MS	$y = -12,16 \ln(x) + 53,53$	95,29	1,34	< 0,01	1,74
35/RO	$y = -11,90 \ln(x) + 59,27$	89,73	2,18	< 0,01	2,83

* y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida

** Concentração calculada pela equação (mg/L).

Tabela 7. Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % do crescimento miceliano (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassicola* para o fungicida epoxiconazol

Isolado	Equação*	R^2	CI_{50}^{**}	p	FRS
01/MG	$y = -9,08 \ln(x) + 59,69$	85,32	2,91	< 0,01	2,78
05/MS	$y = -10,4 \ln(x) + 60,47$	93,71	2,74	< 0,01	2,56
19/MS	$y = -10,84 \ln(x) + 58,77$	94,50	2,25	< 0,01	2,92
21/MS	$y = -10,3 \ln(x) + 60,01$	95,69	2,64	< 0,01	3,43
35/RO	$y = -11,4 \ln(x) + 60,90$	90,52	2,60	< 0,01	3,38

* y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida

** Concentração calculada pela equação (mg/L).

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

Os valores da CI_{50} dos isolados de referência (sensíveis), para o cálculo do FRS foi de 0,20 mg/L para o carbendazim (Tabela 3) e para os triazóis o isolado de referência foi a CI_{50} com valor de 0,77 mg/L (Tabela 6). Observa-se que para o fungicida ciproconazol o valor do FRS variou de 11,96 a 26,39, sendo necessário aumentar de 11,96 a 26,39 vezes a concentração do ingrediente ativo para reduzir em 50% a inibição do crescimento miceliano (Tabela 4).

Na média dos dois experimentos, para o ingrediente ativo carbendazim (Tabela 3), avaliado quanto à inibição do crescimento miceliano para o isolado 01/MG (Figura 1), foi considerado sensível, seguindo a classificação proposta por Edgington et al. (1971). Na concentração de 10 mg/L a inibição do crescimento miceliano foi de 100% (Figura 1 do apêndice 1).

O isolado 35/RO apresentou valor de CI_{50} abaixo de 1 mg/L, sendo considerado sensível. Na concentração de 10 mg/L a inibição do crescimento miceliano foi de 100% (Figura 5 do apêndice 1). Já para os isolados 05/MS, 19/MS e 21/MS, este ingrediente ativo se mostrou atóxico, ou seja, inócuo para estes isolados (REIS et al., 2010) comprovando a perda da sensibilidade destas linhagens para este produto químico (Figura 2 e Figuras 2, 3 e 4 do Apêndice 1).

O fator de redução da sensibilidade foi maior que 200 vezes para os isolados oriundos do Estado do Mato Grosso do Sul (Tabela 3). Ou seja, estes isolados requerem uma concentração do fungicida carbendazim 200 vezes maior para se obter uma redução de

50% do crescimento miceliano. Isto confirma a hipótese de que a falha de controle observada nas últimas safras poderia ser atribuída à redução ou perda da sensibilidade de uma linhagem a este produto químico.

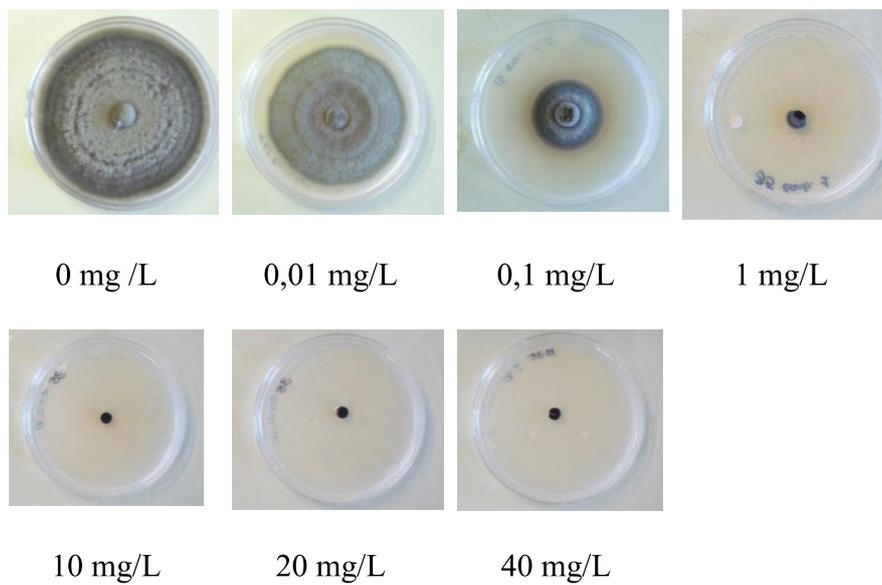


Figura 1. Crescimento miceliano de *Corynespora cassiicola* - Isolado 01/MG em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida carbendazim.

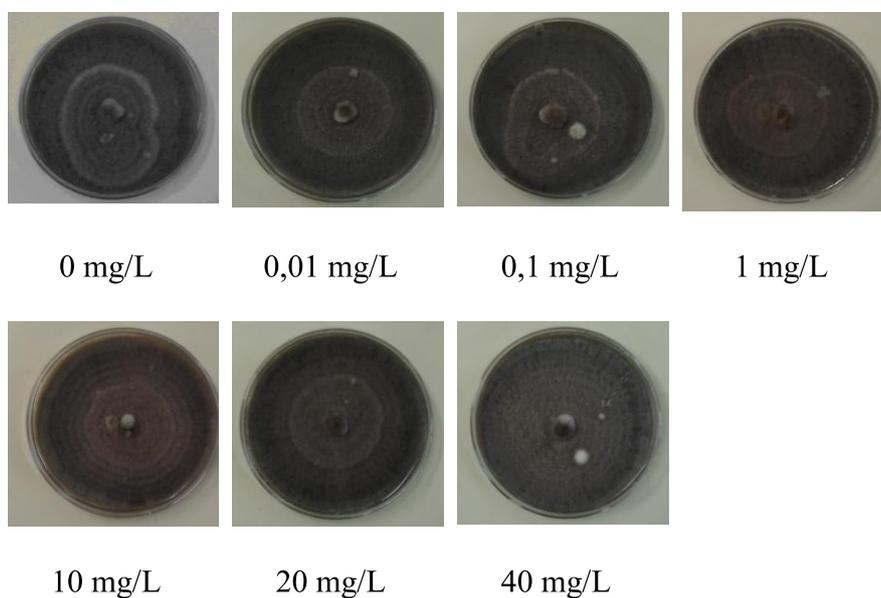


Figura 2. Crescimento miceliano de *Corynespora cassiicola* - Isolado 21/MS em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do fungicida carbendazim.

Considerando os isolados 19/MS e 21/MS e o fungicida carbendazim, a equação de regressão do crescimento miceliano não foi significativa, devido aos isolados não apresentarem nenhuma resposta a este ingrediente ativo. Isto caracteriza a perda da sensibilidade.

Os valores da CI_{50} para o fungicida ciproconazol (Tabela 4) variaram de 9,21 a 20,32 mg/L para os cinco isolados. Comparando-se estes valores, seguindo a classificação de Edgington et al. (1971), estes isolados classificam-se como moderadamente sensíveis para este produto. Talvez, caberia, a partir do que foi proposto por Edgington et al. (1971), outro enquadramento para os isolados. Sugerindo-se: CI_{50} menor que 1 mg/L como sensível, CI_{50}

entre 1 e 10 mg/L moderadamente sensível, CI_{50} entre 10 e 20 mg/L como pouco sensível e CI_{50} acima de 20 mg/L como insensível.

Para os ingredientes ativos tebuconazol e epoxiconazol os valores da CI_{50} situaram-se entre 1,89 e 2,91 mg/L (Tabela 5 e 7). A alteração na sensibilidade de fungos aos fungicidas IDMs é um fenômeno quantitativo (GHINI & KIMATI, 2000; REIS et al., 2010), caracterizando-se por redução gradativa da eficácia, eventualmente recuperada pelo uso de doses mais elevadas.

Dos cinco fungicidas testados *in vitro*, o ingrediente ativo flutriafol, apresentou as menores CI_{50} . Na média, para os cinco isolados (Tabela 8), os valores variaram entre 0,77 e 2,18 mg/L.

Para os fungicidas do grupo químico dos triazóis, não se verificou perda da sensibilidade. Apesar disso, observou-se redução da sensibilidade para alguns isolados. Com exceção dos isolados que foram considerados sensíveis, ou seja, sem alteração na sensibilidade, com valor do fator de redução da sensibilidade (FRS) igual a 1.

Na análise da média para os isolados de *C. cassicola*, considerando os cinco fungicidas, todos apresentaram alteração da sensibilidade. Os isolados 05/MS, 19/MS e 21/MS, na média dos cinco fungicidas, foram os que apresentaram os maiores valores para a CI_{50} , variando de >10,99 a >12,59 mg/L (Tabela 8).

Tabela 8. Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI₅₀) de fungicidas para cinco isolados monospóricos de *Corynespora cassiicola*

Fungicida	Isolados/(CI ₅₀ mg/L)					Média
	01/MG	05/MS	19/MS	21/MS	35/RO	
Carbendazim	B 0,20 c	A > 40 a	A > 40 a	A > 40 a	B 0,26 c	24,09
Ciproconazol	A 15,26 a	A 16,65 b	B 9,21 b	B 12,23 b	A 20,32 a	14,73
Epoconazol	A 2,91 b	A 2,74 c	A 2,25 c	A 2,64 c	A 2,60 b	2,63
Flutriafol	A 1,89 b	A 0,77 d	A 1,26 c	A 1,34 c	A 2,18 b	1,49
Tebuconazol	A 2,21 b	A 2,80 c	A 2,22 c	A 1,89 c	A 2,07 b	2,35
Média	4,49	> 12,59	> 10,99	> 11,62	5,48	
CV (%)	7,27					

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam médias na coluna e as maiúsculas na linha (médias de dois experimentos).

Para o isolado 01/MG, o fungicida carbendazim foi o que apresentou à menor CI₅₀, seguido dos ingredientes ativos epoxiconazol, flutriafol e tebuconazol, que não diferiram estatisticamente entre si. O fungicida ciproconazol foi o menos eficiente para este isolado (Tabela 8).

O ingrediente ativo flutriafol mostrou-se o mais eficiente, para o isolado 05/MS. Em seguida os fungicidas epoxiconazol e tebuconazol que não diferiram entre si, seguido do ciproconazol. Os isolados 05/MS, 19/MS e 21/MS, para o carbendazim não apresentaram nenhuma resposta, podendo-se afirmar que estes isolados perderam a sensibilidade ao fungicida (Tabela 8).

Os ingredientes ativos epoxiconazol, flutriafol e tebuconazol não diferiram entre si para o isolado 19/MS e para o isolado 21/MS, sendo estes considerados os mais fungitóxicos, seguidos do ingrediente ativo ciproconazol (Tabela 8).

De modo geral, entre os triazóis utilizados, o ciproconazol apresentou menor fungitoxicidade a todos os isolados avaliados.

O fungicida do grupo químico dos benzimidazóis (carbendazim) mostrou-se fungitóxico para o isolado 35/RO, seguido por epoxiconazol, flutriafol e tebuconazol. Ciproconazol não apresentou resultados satisfatórios para este isolado, com CI_{50} de 20,32 mg/L (Tabela 8).

A detecção da redução da sensibilidade de *C. cassicola* a fungicidas não é exclusiva de isolados de soja. Na cultura do tomate, em Okayama, no Japão, Date et al. (2004a) comprovaram a redução da fungitoxicidade de fungicidas benzimidazóis e a existência de populações de *C. cassicola* resistentes a este grupo químico.

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

Para o fungicida ciproconazol nenhuma informação é relatada a respeito da fungitoxicidade e valores de CI_{50} para *C. cassicola*, na cultura da soja, *in vitro*. Para *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In. Sorok) Shoem. e *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker, em trigo, STOLTE (2006) encontrou valores de CI_{50} abaixo de 1 mg/L.

Valores de CI_{50} para o fungicida tebuconazol, em outros patossistemas, são relatados. Rodrigues apud Celoto (2009) descreveu o efeito fungitóxico do tebuconazol sobre o crescimento miceliano de *C. cassiicola* isolado de acerola, tendo determinado uma CI_{50} menor que 1 mg/L. Teramoto (2004), na cultura do pepino, e Missio (2004) em acerola verificaram o efeito do tebuconazol sobre *C. cassiicola*, o qual inibiu completamente o crescimento miceliano na concentração de 100 mg/L. Observa-se (Tabela 8) que a menor concentração, capaz de inibir 50% do crescimento miceliano, para o fungicida tebuconazol, foi de 1,89 mg/L e na concentração de 40 mg/L a inibição do crescimento miceliano foi próxima a 100% (Apêndice 5).

Em acerola os fungicidas tebuconazol, carbendazim e epoxiconazol + piraclostrobina apresentaram efeito fungitóxico sobre o crescimento miceliano e germinação de esporos de *C. cassiicola* (CELOTO, 2009). Mas em condições de campo apenas o fungicida carbendazim proporcionou controle satisfatório a doença.

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

Teramoto (2008) relata que o fungicida carbendazim teve pouca eficiência no controle da mancha-alvo em pepino, o que pode ser resultado do surgimento de resistência por parte do patógeno. Estes resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho, para os três isolados procedentes do Estado do Mato Grosso do Sul. Já para

os isolados 01/MG e 35/RO a inibição do crescimento miceliano foi 100% na concentração de 10 mg/L.

Esta mesma autora descreve que os resultados obtidos *in vitro* não tiveram correlação com aqueles obtidos *in vivo*, e que experimentos *in vitro* servem de embasamento aos resultados *in vivo*. Pois, o comportamento das moléculas dos fungicidas no meio de cultura pode ser de uma forma sobre o patógeno e na superfície das plantas ou internamente, estes compostos podem agir de outra. Uma vez que os fungicidas mais eficientes *in vitro* foram o tebuconazol, difenoconazol, mancozebe e captana, e o mais eficiente *in vivo* foi a azoxistrobina. Apenas para os benzimidazóis os resultados foram similares, sendo bastante ineficientes no controle da mancha-alvo tanto *in vitro* como *in vivo*.

4 CONCLUSÕES

Os valores da CI_{50} para o crescimento micelial, gerados neste trabalho, podem ser utilizados como fator de referência para a realização de trabalhos futuros, *in vitro*, de monitoramento da sensibilidade de *Corynespora cassiicola* aos fungicidas, pertencente aos grupos químicos dos benzimidazóis e triazóis, para a cultura da soja.

Os isolados 05/MS, 19/MS e 21/MS apresentam perda da sensibilidade ao ingrediente ativo carbendazim.

O ingrediente ativo ciproconazol, apresenta os maiores valores da CI_{50} entre os demais triazóis testados para todos os isolados avaliados.

Os fungicidas tebuconazol e epoxiconazol apresentam comportamento semelhante para os cinco isolados.

O fungicida flutriafol apresenta resultados satisfatórios nos testes realizados *in vitro* para os cinco isolados. O isolado 05/MS foi o mais sensível para este fungicida.

CAPÍTULO IV

SENSIBILIDADE DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Corynespora cassiicola*, ISOLADOS DA SOJA, A FUNGICIDAS ESTROBILURINAS, *IN VITRO*

AVELINE AVOZANI¹

RESUMO – O fungo *Corynespora cassiicola*, agente causal da mancha-alvo da soja pode causar danos de até 50%. O controle do patógeno em órgãos aéreos é realizado através de aplicações de fungicidas. Relatos da ineficiência do controle desta doença em soja levaram a realização de trabalhos para testar a sensibilidade de esporos de *C. cassiicola* a fungicidas através da avaliação da germinação de esporos de cinco isolados obtidos no ano de 2009. Em placas de petri contendo meio de cultura ágar-água adicionou-se fungicida nas concentrações de 0; 00,1; 0,1; 1; 10; 20 e 40 mg/L. Foram colocados 350 µL da suspensão de conídios, em cada placa, os quais foram incubados por seis horas em câmara de crescimento, 25± 2°C e luz contínua. Os fungicidas testados foram azoxistrobina, piraclostrobina e picoxistrobina. O experimento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e repetido duas vezes. Os resultados da porcentagem da inibição da germinação foram submetidos à análise de regressão, logarítmica, calculando-se a

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração Fitopatologia.

concentração inibitória de 50 % (CI₅₀) através da equação gerada. A perda total da sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* para o grupo químico das estrobilurinas não foi verificada. Verificou-se a redução da sensibilidade para alguns isolados.

Palavras-chave: Fungitoxicidade, estrobilurinas, mancha-alvo, conídios.

***IN VITRO* SENSITIVITY OF SPORE GERMINATION OF
Corynespora cassiicola, ISOLATED SOYBEAN, TO
STROBILURIN FUNGICIDES**

ABSTRACT - The fungus *Corynespora cassiicola*, causal agent of soybean target leaf spot can cause damage up to 50%. The control of the pathogen in the above ground plant parts is accomplished through the application of fungicides. Reports about the inefficiency of the management of this disease in soybean led to undertaking this work to test the sensitivity of spores of *C. cassiicola* to fungicides by assessing the spores germination of five isolates obtained in 2009. Petri dishes containing water agar amended with concentrations of 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 20 and 40 mg/L were prepared for azoxystrobin, pyraclostrobin and picoxystrobin. Three hundred and fifty mL of conidial suspension was poured in each plate, and incubated for six hours in a growth chamber, 25 ± 2 ° C and a photoperiod of 12 hours.. The trial was conducted in a randomized design with four replications and performed twice. The results of the spore germination inhibition percentage were submitted to non-logarithmic regression analysis and calculated the

50% inhibitory concentration (IC₅₀) using the generated equation. The sensitivity reduction of *C. cassicola* strains for azoxistrobin was verified.

Key words: Fungitoxic, strobilurin, target spot, conidial.

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curtis) Wei (1950) é o agente causal da mancha-alvo em soja. Este gênero já foi relatado em mais de 300 espécies hospedeiras (FARR et al., 2011) e em mais de 70 países de clima tropical e subtropical (SILVA et al., 1995; FARR et al., 2011). Por essas características Ellis (1971) descreveu *C. cassiicola* como uma espécie cosmopolita e inespecífica. Entretanto, outros autores relatam que *C. cassiicola* é específica para determinados hospedeiros (DIXON et al., 2009) e a existência de especialização foi reconhecida por Spencer & Walter (1969).

Devido ao ambiente favorável, temperaturas entre 22 e 30 °C, molhamento foliar prolongado, monocultivo e plantio direto, nas últimas safras (SILVA et al., 2008), houve um aumento da intensidade da doença e de reclamações da eficácia do controle químico da mancha-alvo, principalmente na região do cerrado brasileiro (EMBRAPA, 2010).

Uma das principais medidas de controle para essa doença é o uso de variedades com resistência genética. A uniformidade genética, em mais de 30% da área, pode favorecer o patógeno, causando danos severos a cultura, ou então, a quebra da resistência do cultivar (SILVA et al., 2008). Portanto, uma opção a curto prazo para os produtores, visando o controle desta doença, é o uso de fungicidas.

Até o momento não estão disponíveis, indicações para o controle químico específico para esta doença em soja. Os fungicidas indicados são os mesmos recomendados para o controle de doenças de final de ciclo (DFC), e incluem os ingredientes ativos azoxistrobina +

ciproconazol, carbendazim, difenoconazol, flutriafol, piraclostrobina + epoxiconazol, tebuconazol, tiofanato metílico + flutriafol, trifloxistrobina + ciproconazol, trifloxistrobina + propiconazol (EMBRAPA, 2007).

O uso de fungicidas esta entre um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, pela facilidade de aplicação e pelos resultados imediatos obtidos. Porém, seu uso sucessivo pode promover a seleção de linhagens de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida. Atualmente, a resistência vem sendo um dos mais importantes problemas do controle químico das doenças de plantas (GHINI & KIMATI, 2000).

O problema da falha do controle químico se iniciou após o surgimento dos fungicidas sistêmicos, que atuam em um ou poucos processos do metabolismo da célula do fungo. Diferentemente dos fungicidas protetores convencionais ou inespecíficos, que interferem em muitos processos metabólicos do fungo, os casos de relatos de resistência na década de 70 limitavam-se a menos de 10 gêneros de fungos. Em contraposição, em 1988, com o intenso uso dos fungicidas sistêmicos esse número passou, aproximadamente, para 60 gêneros (GHINI & KIMATI, 2000 apud DELP, 1988).

O desenvolvimento da resistência depende da frequência (porcentagem da população do fungo com linhagens resistentes) e do grau de resistência ou fator de resistência da sensibilidade (FRS) (GHINI & KIMATI, 2000).

Os fungicidas pertencentes ao grupo químico estrobilurinas agem pela inibição da respiração mitocondrial, indisponibilizando o oxigênio para a célula. A germinação dos esporos

é a fase do ciclo biológico dos fungos com maior sensibilidade às estrobilurinas. Por isso, na determinação da fungitoxicidade desses compostos recomenda-se usar testes da germinação de esporos *in vitro* (REIS et al., 2010). Porém, para outros autores, esta metodologia de germinação de esporos apresentam limitações, principalmente, no que diz respeito a sua correlação com respostas obtidas com o crescimento da colônia do fungo em meio de cultura. Outra limitação estaria relacionada ao fungicida, mais especificamente, se no momento da germinação do esporo o alvo do fungicida estaria ativo (BLUM, 2009 apud PONTZEN & SCHEIPFLUG, 1989).

Com a realização deste trabalho objetivou-se a determinação da sensibilidade, *in vitro*, de cinco isolados de *C. cassicola*, isolados da soja, baseada na germinação de esporos, para fungicidas do grupo químico estrobilurinas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A quantificação da sensibilidade de *C. cassicola* a fungicidas, *in vitro*, baseada na germinação dos conídios, foi realizado no Laboratório de Fitopatologia/Micologia da Universidade de Passo Fundo (UPF) no período de maio de 2009 a agosto de 2010. Para cada fungicida testado, o estudo foi repetido duas vezes.

Os isolados utilizados nesse experimento constam na Tabela 1, sendo os mesmos testados quanto à sensibilidade miceliana deste fungo a fungicidas, descrito no capítulo anterior, os quais foram isolados de folhas de soja com os sintomas da doença e preservados em geladeira em meio BSA.

Tabela 1. Identificação dos isolados monospóricos de *Corynespora cassiicola*

Isolado	Estado	Genótipo	Código
01	Minas Gerais	Linhagem	01/MG
05	Mato Grosso do Sul	Monsoy 8001	05/MS
19	Mato Grosso do Sul	Linhagem	19/MS
21	Mato Grosso do Sul	Monsoy 8336	21/MS
35	Rondônia	Linhagem	35/RO

2.1 Determinação da sensibilidade da germinação de esporos de *Corynespora cassiicola* a fungicidas, *in vitro*.

Para a determinação da sensibilidade de *C. cassiicola* a fungicidas, os ingredientes ativos testados foram: azoxistrobina (Priori 250 SC), picoxistrobina (Acapela 250 SC) e piraclostrobia (Comet 250 CE).

Os fungicidas foram transferidos com o auxílio de um micropipetador para um erlenmeyer de 250 mL contendo água destilada e esterilizada (ADE), resultando em um volume final de 100 mL. Desta primeira solução fungicida transferiu-se 1 mL para 99,0 mL de ADE para outro erlenmeyer, constituindo a segunda solução.

Sete concentrações de ingrediente ativo diluídas em água destilada e esterilizada foram testadas, sendo elas, 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 20 e 40 mg/L. A primeira solução foi utilizada para obter as concentrações de 10 a 40 mg/L e a segunda para obter as concentrações de 0,01 a 1,0 mg/L. A concentração de 0 mg/L, ou ausência de fungicida representou a testemunha do experimento. Em seguida, estas concentrações foram adicionadas ao meio de cultura ágar-água, o qual foi vertido, após a homogenização, a uma

temperatura aproximadamente de 45 °C em placas de petri esterilizadas (60 x 10 mm).

Suspensões de esporos de *C. cassicola* foram obtidas utilizando colônias com duas semanas de crescimento. Os esporos foram removidos através da raspagem, com o auxílio de um pincel de pelo de camelo número 20, sobre a colônia, contendo aproximadamente 10 mL de água destilada e esterilizada, para a remoção dos conídios.

No dia seguinte ao preparo dos meios, foram adicionados 350 µL da suspensão de conídios em cada placa de petri. As placas foram levadas para a câmara de crescimento e incubadas à temperatura de 25 ± 2 °C e luz contínua, fornecida por três lâmpadas fluorescentes 40 W situadas 50 cm acima das placas de petri. Decorrido o tempo de seis horas, a germinação foi interrompida com a adição de gotas de solução contendo acetona e o corante de alimentos Anilina.

Com base nos resultados obtidos por Muliterno de Melo (2009) adotou-se o tempo de exposição de 6 horas, para a paralisação da germinação dos conídios.

2.2 Avaliação da germinação dos conídios

A unidade experimental foi constituída por uma placa de petri em delineamento inteiramente casualizado, constituída de sete tratamentos, em quatro repetições.

As placas foram mantidas em refrigerador, para posterior avaliação, a qual se baseou na quantificação de 100 conídios, entre

germinados e não germinados. A observação foi realizada com o auxílio de microscópio óptico, aumento de 400 x, e de dois contadores, através da varredura da placa de petri. Considerou-se conídio germinado, aquele que possuía comprimento do tubo germinativo igual ou maior ao menor diâmetro do conídio (ZADOKS & SCHEIN, 1979).

O tubo germinativo é definido como uma hifa curta que cresce a partir do poro germinativo (abertura da parede do esporo) ou fenda germinativa (fissura longitudinal na parede do esporo) durante a germinação e que apresenta desenvolvimento contínuo sob condições climáticas favoráveis formando uma hifa de maior comprimento. O conjunto de hifas representa o micélio e assim, por esses processos o fungo se desenvolve (ULLOA & HANLIN, 2000).

2.3 Análise estatística

Com os dados obtidos da germinação dos cinco isolados para cada ingrediente ativo, calculou-se a porcentagem de inibição da germinação e realizou-se análise de regressão, logarítmica, utilizando-se o programa estatístico Costat e o Microsoft Excel.

A concentração inibitória capaz de inibir 50 % (CI_{50}) da germinação do esporo para os fungicidas testados, para cada isolado, foi calculada pela equação gerada.

O fator de redução da sensibilidade é uma ferramenta útil para quantificar quantas vezes a concentração do fungicida é aumentada para se obter uma redução de 50 % da germinação dos esporos (REIS et al., 2010). Este foi calculado pela divisão do valor da

CI₅₀ do isolado suspeito de ter alterado a sensibilidade pela CI₅₀ do isolado sensível.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da regressão entre a germinação dos esporos (variável dependente y) e a concentração do fungicida (variável independente x), o modelo logarítmico foi o que melhor representou a relação entre as duas variáveis. O maior coeficiente de determinação (R^2) foi obtido para este modelo.

A sensibilidade dos cinco isolados quanto a germinação dos esporos, média das duas repetições do experimento, para os fungicidas do grupo químico das estrobilurinas encontram-se nas Tabelas 2, 3 e 4. Pode-se observar que em nenhuma concentração a inibição da germinação foi de 100% (Figuras dos apêndices 6, 7 e 8).

Tabela 2. Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % da germinação dos esporos (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassiicola* para o fungicida azoxistrobina

Isolado	Equação *	R^2	CI_{50}^{**}	p	FRS
01/MG	$y = -5,84 \ln(x) + 44,27$	96,89	0,37	< 0,01	1,00
05/MS	$y = -6,47 \ln(x) + 67,74$	84,94	13,67	< 0,01	36,9
19/MS	$y = -7,38 \ln(x) + 60,48$	94,59	4,14	< 0,01	11,1
21/MS	$y = -6,08 \ln(x) + 63,77$	90,95	9,63	< 0,01	26,0
35/RO	$y = -7,39 \ln(x) + 52,06$	97,23	1,32	< 0,01	3,57

* y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida

** Concentração calculada pela equação (mg/L).

Tabela 3. Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % da germinação dos esporos (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassiicola* para o fungicida piraclostrobina

Isolado	Equação *	R^2	CI_{50}^{**}	p	FRS
01/MG	$y = -8,13 \ln(x) + 53,65$	95,78	1,63	< 0,01	4,41
05/MS	$y = -7,85 \ln(x) + 58,47$	96,98	3,06	< 0,01	8,27
19/MS	$y = -8,09 \ln(x) + 50,64$	98,68	1,08	< 0,01	2,92
21/MS	$y = -7,73 \ln(x) + 47,60$	99,18	0,73	< 0,01	1,97
35/RO	$y = -8,37 \ln(x) + 48,65$	99,00	0,85	< 0,01	2,30

* y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida

** Concentração calculada pela equação (mg/L).

Tabela 4. Isolados, equação, coeficiente de determinação (R^2), concentração inibitória de 50 % da germinação dos esporos (CI_{50}), significância e fator de redução da sensibilidade (FRS) de *Corynespora cassiicola* para o fungicida picoxistrobina

Isolado	Equação *	R^2	CI_{50} **	p	FRS
01/MG	$y = -6,22 \text{ Ln}(x) + 53,99$	99,12	1,90	< 0,01	5,14
05/MS	$y = -6,73 \text{ Ln}(x) + 52,58$	96,08	1,47	< 0,01	3,97
19/MS	$y = -6,58 \text{ Ln}(x) + 53,03$	95,58	1,58	< 0,01	4,27
21/MS	$y = -6,47 \text{ Ln}(x) + 63,58$	95,90	8,16	< 0,01	22,0
35/RO	$y = -6,36 \text{ Ln}(x) + 46,79$	90,83	0,60	< 0,01	1,62

* y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano, x = concentração do fungicida

** Concentração calculada pela equação (mg/L).

A CI_{50} para a germinação de esporos de *C. cassiicola* e o fungicida azoxistrobina (Tabela 2) variou de 0,37 a 13,67 mg/L. Na concentração de 40 mg/L a porcentagem da germinação variou de 21,50 a 37% (Figuras do apêndice 6). Os isolados oriundos do Estado do Mato Grosso do Sul, foram os que apresentaram o maior valor da CI_{50} e do fator de redução da sensibilidade (FRS). Os isolados 05/MS, 19/MS, 21/MS e 35/RO foram classificados em moderadamente sensíveis de acordo com a classificação proposta por Edgington et al. (1971). Observa-se que para inibir 50% da germinação dos esporos para o isolado 05/MS foi necessário aumentar a concentração do fungicida em 36,9 vezes (Tabela 2), sendo este valor do fator de redução da sensibilidade (FRS) o maior encontrado para o grupo químico das estrobilurinas.

Para os princípios ativos piraclostrobina e picoxistrobina, os valores da CI_{50} variaram de 0,60 a 8,16 mg/L (Tabelas 3 e 4).

Em análise das médias para os três fungicidas, o isolado 35/RO foi o mais sensível, com valor da CI_{50} de 0,92 mg/L, sendo o isolado 21/MS o menos sensível com valor médio da CI_{50} de 6,17 mg/L (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração inibitória de 50% (CI_{50}) da germinação dos conídios isolados de *Corynespora cassicola* a fungicidas

Fungicida	Isolado (CI_{50} /mg/L)					Média
	01/MG	05/MS	19/MS	21/MS	35/RO	
Azoxistrobina	E 0,37 b	A 13,67 a	C 4,14 a	B 9,63 a	D 1,32 a	6,20
Picoxistrobina	B 1,90 a	BC 1,47 c	BC 1,58 b	A 8,16 a	C 0,60 a	2,74
Piraclostrobina	B 1,63 a	A 3,06 b	B 1,08 b	B 0,73 b	B 0,85 a	1,47
Média	1,30	6,07	2,27	6,17	0,92	
CV (%)	7,34					

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam médias na coluna e as maiúsculas na linha.

Houve interação diferencial entre isolado e fungicida (Tabela 5). Para o ingrediente ativo azoxistrobina o isolado 01/MG foi o mais sensível e o isolado 05/MS o menos sensível. Já para picoxistrobina o isolado 35/RO mostrou-se mais sensível e o 21/MS o menos sensível.

Observa-se que, para os fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina o isolado 05/MS apresentou os maiores valores para a CI_{50} , o mesmo não aconteceu com o fungicida picoxistrobina (Tabela 5). Esta variação poderia ser devido à variabilidade do fungo.

São poucos os trabalhos na literatura que relatam a eficácia do controle químico nesse patossistema. Existem informações divergentes entre pesquisadores que dificultam ainda mais o

entendimento para o controle desta doença. Isto pode ser explicado devido às diferenças entre as populações do patógeno de cada região e a variabilidade do fungo (SILVA et al., 2008).

Relatos de fungos resistentes aos fungicidas do grupo químico das estrobilurinas obtidos em laboratórios apresentaram mutações no gene do citocromo *b*. Os sensíveis apresentaram um menor crescimento *in vitro*, devido às deficiências respiratórias. O gene do citocromo *b* é mitocondrial, sendo este o primeiro caso onde o sítio visado pelo fungicida é codificado por um gene extra nuclear. É provável que a resistência seja de múltiplos passos, através de um gradual aumento da proporção de mitocôndrias resistentes (GHINI & KIMATI, 2000).

Blum (2009), avaliando o controle químico de *Phakopsora pachyrhizi* (Sidow) determinou valores de CI_{50} , *in vitro* para a germinação de uredosporos. A CI_{50} variou de 0,004 e 0,3 mg/L para piraclostrobrina e 0,01 e 0,07 mg/L para picoxistrobrina. Comparativamente, *P. pachyrhizi* é mais sensível às estrobilurinas que *C. cassicola*.

Em acerola os fungicidas epoxiconazol + piraclostrobrina apresentaram efeito fungitóxico sobre o crescimento miceliano e a germinação de esporos de *C. cassicola* (CELOTO, 2009). Estes ingredientes ativos inibiram completamente a germinação de esporos na concentração de 1 mg/L e 80 % do crescimento miceliano na concentração de 1000 mg/L.

Date et al. (2004b) testaram a sensibilidade de 193 isolados de *C. cassicola* na cultura do pepino e verificaram a ocorrência da resistência de um isolado para o fungicida

azoxistrobina. Neste trabalho, os cinco isolados estudados não apresentaram perda da sensibilidade para o mesmo ingrediente ativo. Porém, os isolados de Mato Grosso do Sul mostraram-se menos sensíveis que os demais.

Blum (2009) em experimentos para testar a sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas, em soja, encontrou que para inibir em 50% a germinação dos uredosporos, nas duas vezes em que o experimento foi realizado, para azoxistrobina este valor ficou entre 0,01 e 0,16 mg/L.

Em comparação com descrições da literatura Teramoto (2008) verificou que o fungicida azoxistrobina foi um dos mais eficientes quando aplicado preventivamente e curativamente, na cultura do pepino. Porém, apresentou baixa eficiência quando a pressão do inóculo aumentou e o produto foi aplicado de forma curativa, refletindo em altas porcentagens de severidade.

Em estudos conduzidos a campo no município de Campo Verde, utilizando a cultivar TMG 132RR, Avalhaes et al. (2010) observaram ganho em produtividade em diferentes programas de aplicação com o uso de azoxistrobina + ciproconazol.

Forcelini (2010) descreve que um dos fatores que pode comprometer a ação dos fungicidas sobre os fungos necrotróficos é devido à produção de esporos acontecer nos tecidos mortos, portanto são tecidos não funcionais, onde não há movimentação e ação dos fungicidas.

Em face dos resultados obtidos nos experimentos, levantam-se as seguintes sugestões e hipóteses:

I - Este trabalho deveria ter sido realizado antes do uso dos fungicidas na cultura da soja, pois poderia ter ocorrido alteração da sensibilidade para as linhagens consideradas sensíveis. Os menores valores da CI_{50} , tomados como referência podem não refletir a realidade de serem os mais sensíveis. Ou seja, sua sensibilidade pode estar reduzida.

II – Sugere-se estudos para o desenvolvimento da melhor metodologia para a condução de trabalhos realizados *in vitro*, para a sensibilidade de fungos a fungicidas.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a redução da sensibilidade de alguns isolados de *C. cassicola* para as estrobilurinas.

Com relação aos valores de CI_{50} , obtidos neste trabalho, se observa um comportamento diferenciado entre os isolados e entre as estrobilurinas avaliadas.

A ocorrência de perda de sensibilidade para as estrobilurinas não foi verificada.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, A. M. R.; YAMASHITA, J. Efeito da técnica de inoculação de *Corynespora cassiicola* na reação de três cultivares de soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 3, p. 55-58, 1978.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA L. P.; YORINORI J. T.; SILVA J. F. V.; HENNING A. A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. *Manual de Fitopatologia*. 3 ed. v. 2, p. 642 – 664, 1997.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER M. C. Doenças de soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. *Manual de Fitopatologia*, 4 ed. v. 2, p. 569 – 588, 2005.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia*, 3ed, v.1, p. 647-671, 1995.

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

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

BARNETT, H. L., HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 2 ed. Mineapolis, Minessotta, 1972.

BLACK, R. J. Complexo soja: Fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M.S. *Soja tecnologia da produção II*. Piracicaba/SP, 2000, 450 p.

BLUM, M. M. C. *Sensibilidade de Phakopsora pachyrhizi a fungicidas*. 2009. 173 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

BOTTA, E. D. Patógenos fúngicos de sementes de soja provenientes de cultivos no Noroeste Argentino. In: IV Conferencia Mundial de Investigacion en soja. World Aoybean Research Conference IV, 3., 1989, Buenos Aires, Argentina. 1989. p. 396.

CARRIS, L. M.; GLAWE, A. Isolation of the soybean pathogens *Corynespora cassiicola* and *Phialophora gregata* from cysts of *Heterodera glycines* in Illinois. *Mycologia*, n. 78, p. 503-506, 1986.

CELOTO, M. I. B. *Fisiologia e manejo de Corynespora cassicola (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei, causador da mancha alva na cultura da acerola (Malpighia emarginata D. C.)*. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Agronomia) Faculdade de Engenharia – UNESP, Ilha Solteira, 2009.

CONAB 2011 – Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2010/2011 – Quarto levantamento – janeiro de 2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_lev_safra_2010_2011..pdf. Acesso em: 15 de janeiro de 2010.

COSTAMILAN, L. M.; LHAMBY, J. C. B.; BONATO, E. R. Sobrevivência de fungos necrotróficos em restos de cultura da soja, em sistema de plantio direto. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, p. 175-177, 1999.

CUTRIM, A. F.; SILVA, S. G. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 2, Brasília, 2003.

DATE, H.; KATOAKA, E.; TANINA, K.; SASAKI, S.; INOUE, K.; NASU, H.; KASUAYAMA, S. Sensitivity of *Corynespora cassiicola*,

causal agent of *Corynespora* target spot of tomato, to thiophanate-methyl and diethofencarb. *Japan Journal of Phythopayhology*. v. 70, p. 7-9, 2004a.

DATE, H.; KATOAKA, E.; TANINA, K.; SASAKI, S.; INOUE, K.; NASU, H.; KASUAYAMA, S. Sensitivity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of *Corynespora* target spot of cucumber, to thiophanate-methyl, diethofencarb and azoxystrobin. *Japan Journal of Phythopayhology*. v. 70, n. 1 p. 10-13, 2004b.

DIXON, L. J.; SCHLUB, R. L.; PERNEZNY, K.; DATNOFF, L. E. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*. v. 99, p. 1015-1027, 2009.

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

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

EMBRAPA. *Tecnologias de produção da soja. Tecnologias de produção de Soja Região Central do Brasil*. Versão eletrônica. Embrapa, 2003.

EMBRAPA. *Sistema de produção. Tecnologia de Produção de Soja da Região Central do Brasil*. Londrina PR, 2007, 225 p.

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

FARR, D. F.; ROSSMAB, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. *Fungal databases. Systematic Botany and Mycology Laboratory, ARS, USD*. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>. Acesso em: 23 fevereiro 2011.

FERNANDEZ, M. R. *Manual para laboratório de fitopatologia*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 126 p.

FORCELINI, C. A. Doenças em soja: entendendo as diferenças entre biotróficos e necrotróficos. *Revista Plantio Direto*, Passo Fundo, XX, ed 120, p. 7-10, 2010.

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

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. Target spot In: Compendium of soybean Diseases. 4ed. St Paul, Minnesota: *American Phytopathological Society*, p. 27, 1999.

HARTWIG, E. E. Effect of target spot on yield of soybeans. *Plant Disease Reporter*, v. 43 n. 4, 1959.

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

KOENNING, S. R.; CRESWELL, T. C. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in southeastern United States. *Plant Disease*, v. 90, n. 7, p. 974, 2006.

KRUGNER, T. L.; BACHCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia*, 3ed, v.1, p. 46-96, 1995.

JULIATTI, F.; POLIZEL, A. C.; JULIATTI, F. C. Manejo integrado de doenças na cultura da soja. 1 ed. Uberlândia, 2004, 327 p.

MISSIO, V. C. *Eficiência do uso de indutores de resistência de plantas no controle da antracnose e mancha alvo da acerola (Malpighia emarginata D. C.)* 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2004.

MOREIRA, E. N.; COSTA, M. J. N.; WAGNER, J. R. A.; RIBOLI, E.; CASONATTO, A.; LUPATINI, F. Momento, número de aplicações e desenvolvimento de fungicidas no controle da mancha

alvo da soja. *Tropical Plant Pathology*, Cuiabá, v. 35, p.79, 2010. Suplemento.

MULITERNO de MELO, M. *Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja*. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Passo Fundo) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

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

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

OLIVEIRA, R. R.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; AGUIR, B. M.; CAIXETA, M. P. Reação de híbridos de pepino para cultivo protegido a isolados de *Corynespora cassiicola*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 509-511. 2006.

PANIQUE, T. N. La mancha anillada de la soya (*Corynespora cassiicola*), *Fundacruz*, Bolívia, 2007.

POZZA, E. A.; SOUZA, P. E.; CASTRO, H. A.; POZZA, A. A. A. Freqüência da ocorrência de doenças da parte área de plantas na região de Lavras - MG. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1001-1005, 1999.

REIS, A.; BOITEUX, S. L. Mancha-de-corynespora do tomateiro. *Comunicado técnico*, Brasília, n.41, p. 01-05, 2007.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A. Controle cultural. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Ceres, 1995. p. 710-716.

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

REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO SUL, 36., 2008, Porto Alegre. *Indicações Técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina 2008/2009*. Porto Alegre: Fepagro, 2008. 144 p.

ROIM, F. F. B. *Morfologia e patologia de isolados de Corynespora cassiicola obtidos de mancha foliar (mancha-alvo) e podridão radicular da soja*. 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Jaboticabal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2001.

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

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

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

SINCLAIR, L. B.; SHURTLEFF, M. C. Compendium of soybean Disease. Ed. St Paul, Minnesota: *American Phytopathological Society*, 1975, 69 p.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. Compendium of soybean Disease. 3 ed. Ed. St Paul, Minnesota: *American Phytopathological Society*, 1989, 106 p.

SPENCER, J. A.; WALTERS, H. J. Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, v. 59, p. 58-60, 1969.

STAUB, T.; SOZZI, D. Fungicide Resistance. *Plant Disease*, v. 86, n.12, p. 1026-1031, 1984.

STOLTE, R. E. *Sensibilidade de Bipolaris sorokiniana e de Drechslera tritici-repentis a fungicidas in vitro*. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Passo Fundo) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M. C.; FISCHER, I. H.; ANGELI, S.S.; SCHIMIDT, D. F.; VEIGA, J. Controle químico *in vitro* de *Corynespora cassiicola*, agente causal da mancha alvo em pepino. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, n. 37, p. 85-86, 2004. Resumos.

TERAMOTO, A.; SALVAIA, A.; MARTINS, M. C. Sensibilidade *in vitro* de *Corynespora cassiicola* obtidos de diversas culturas a fungicidas. In: *Congresso Paulista de Fitopatologia*. Botucatu, 2005, p.39, Resumo.

TERAMOTO, A. *Caracterização Morfológica, fisiológica, isoenzimática e controle de isolados de Corynespora cassiicola (Berky & Curt) Wei, agente causal da mancha alvo*. 2008. 81 f. Tese (Doutorado em Agronomia Produção Vegetal Goiás) - Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2008.

ULLOA, M.; HANLIN, R. T. *Illustrated Cictionary of Mycology*. St. Paul: *The American Phytopathological Society*, 2000, 448 p.

VEIGA, P. Mancha alvo: Uma nova doença da soja no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Centro Ciências Rurais*, v. 8, n. 1, p. 79-82, 1978.

VIEGAS, A. P. *Dicionário de Fitopatologia e micologia*. Instituto agrônômico de campinas. Ed Ceres. São Paulo. p. 194, 1979.

ZADOCKS, J. C.; SCHEIN, R. *Epidemiology and Plant Disease Management*. New York: Oxford university Press, 1979, 427 p.

ZAMBOLIM, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. Manejo Integrado de doenças da mangueira. In: ROSANE, D.E.; DAREZZO, R.J.; AGUIAR, R,L.; AGUILERA, G.H.A.; ZAMBONIM, L. Manga: produção integrada, industrialização e comercialização. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 1, p. 377- 408, 2004.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. *Manejo da resistência de fungos a fungicidas*. Viçosa, MG: UFV, DFP, 2007. 168p.

YORINORI, J. T. Doenças da soja . In: Fundação Cargill.- A soja da região central, Campinas, 159-215, 1977.

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

YORINORI, J. T. Epidemia de mancha alvo (*Corynespora cassiicola*) na cultivar FT-Estrela na safra 1996/97. *XVIII Reunião de Pesquisa Soja da Região Central do Brasil*. Uberlândia, p.319, 1996.

YORINORI, J. T. Controle integrado de doenças de soja. In: *Resultados de pesquisa de soja*, 1997. Londrina, Embrapa - CNPSo, p. 83, 1997.

YORINORI, J. T. Controle integrado das principais doenças da soja. In: *Soja Tecnologia da Produção*, Embrapa, Piracicaba, 1998, 293 p.

WEI, C. T. Notes on *Corynespora*. *Mycological Papers*. v. 30, n. 24, 1950, 10 p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Fungicida carbendazim

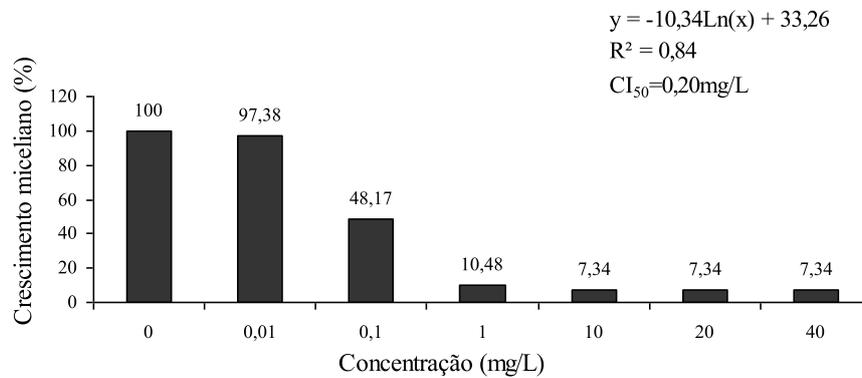


Figura 1: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 01/MG, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida carbendazim. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

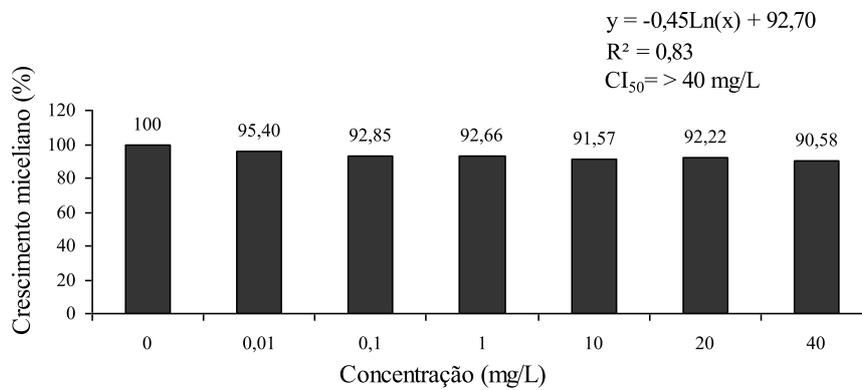


Figura 2: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 05/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida carbendazim. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

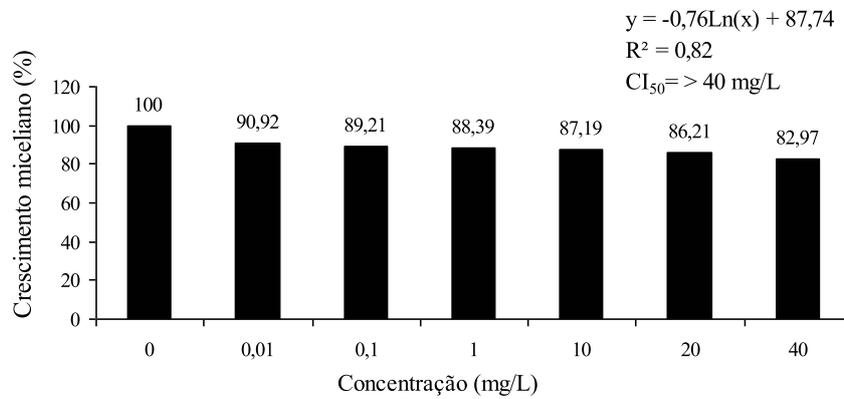


Figura 3: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 19/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida carbendazim. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

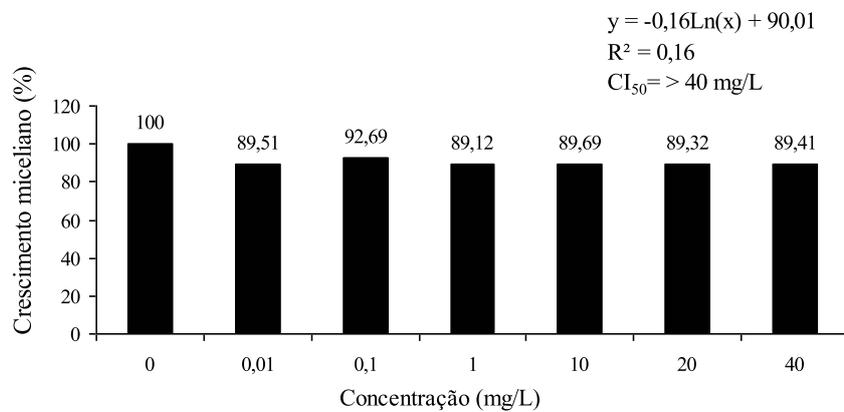


Figura 4: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 21/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida carbendazim. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

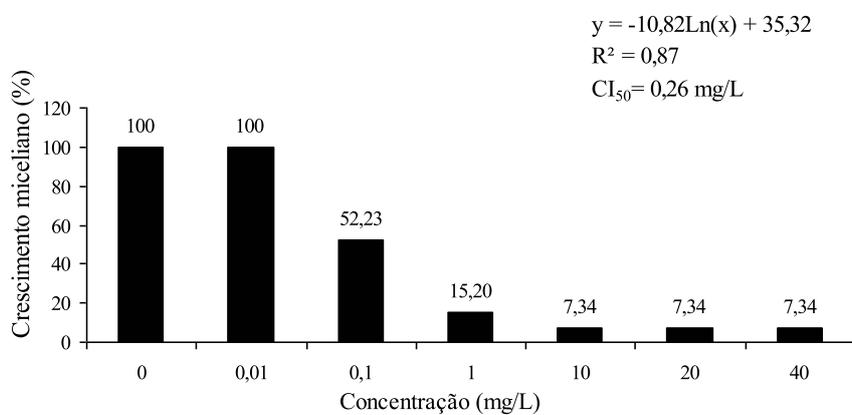


Figura 5: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 35/RO, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida carbendazim. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

APÊNDICE 2 – Fungicida ciproconazol

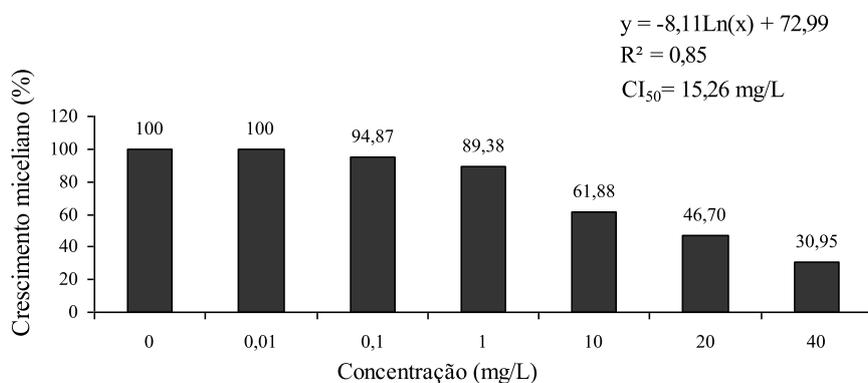


Figura 1: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 01/MG, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

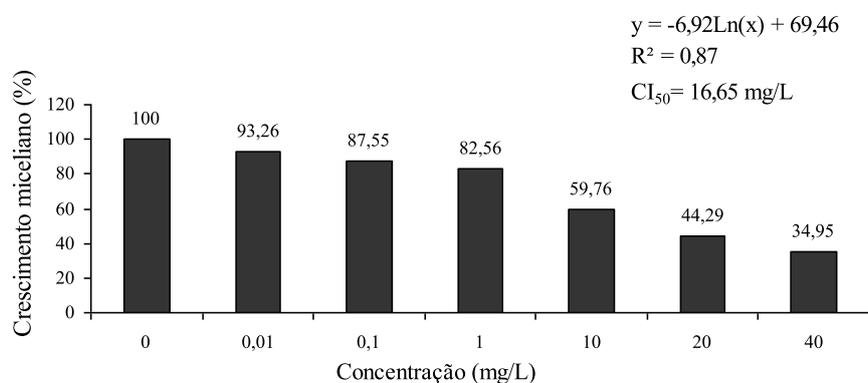


Figura 2: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 05/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

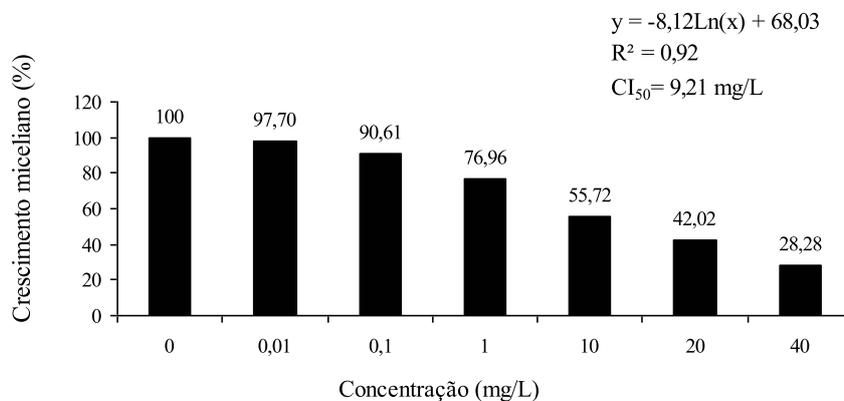


Figura 3: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 19/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

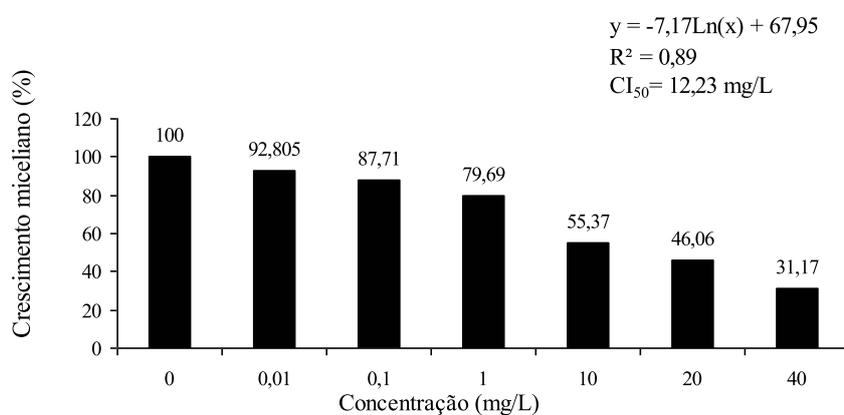


Figura 4: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 21/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

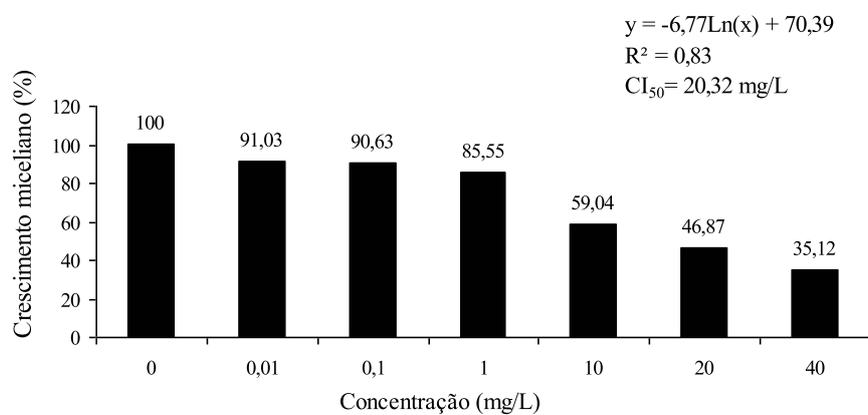


Figura 5: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 35/RO, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida ciproconazol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

APÊNDICE 3 – Fungicida epoxiconazol

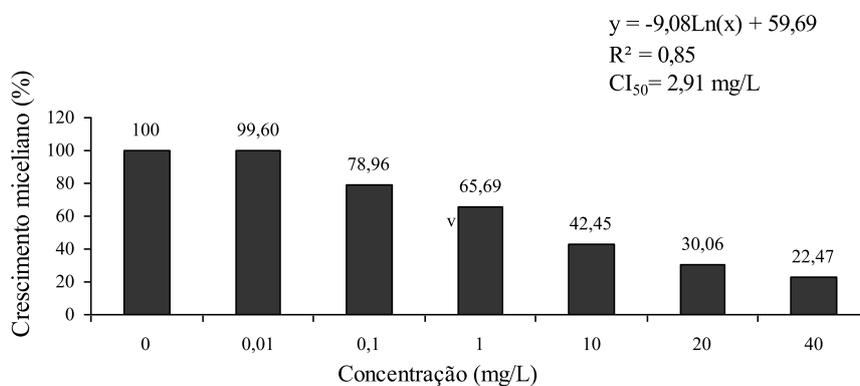


Figura 1: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 01/MG, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

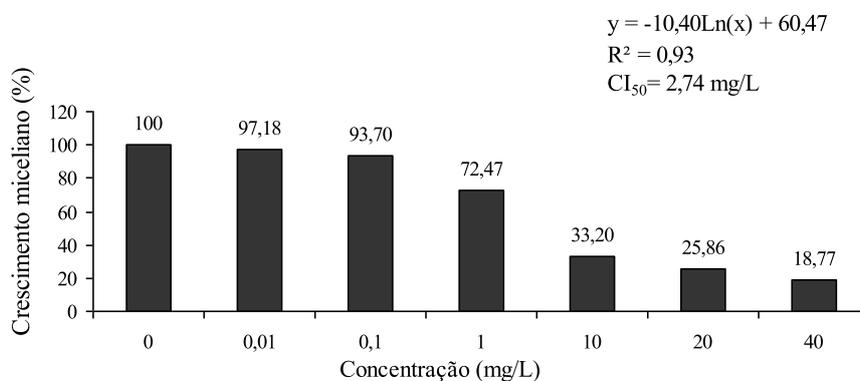


Figura 2: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 05/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

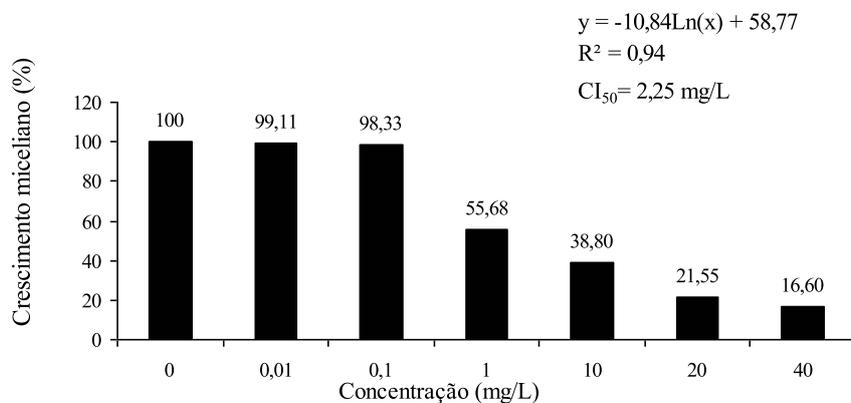


Figura 3: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 19/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

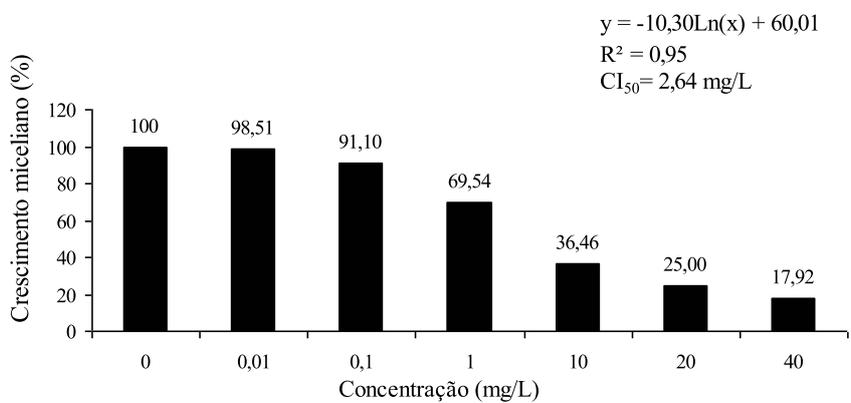


Figura 4: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 21/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

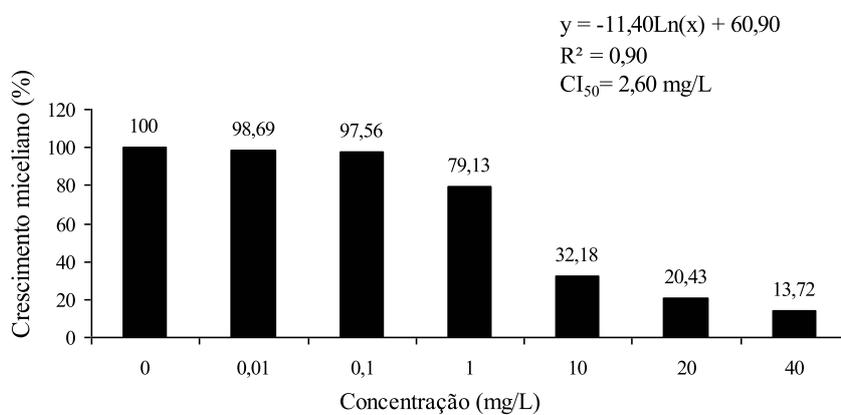


Figura 5: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 35/RO, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida epoxiconazol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

APÊNDICE 4 – Fungicida flutriafol

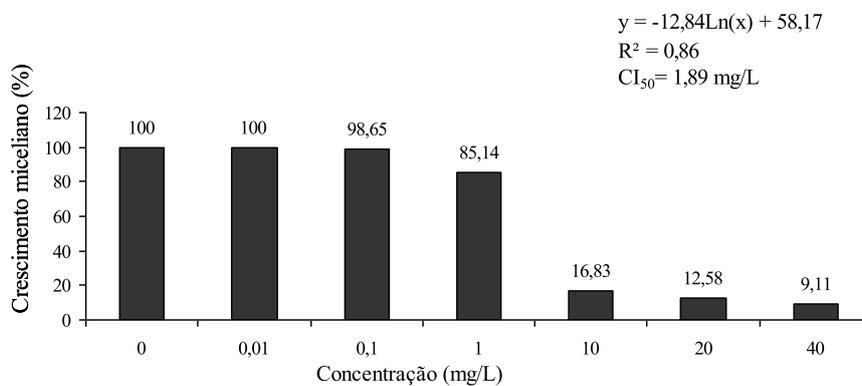


Figura 1: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 01/MG, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida flutriafol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

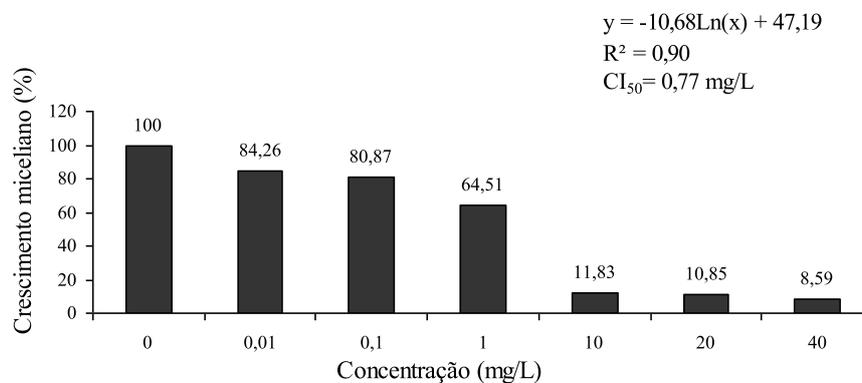


Figura 2: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 05/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida flutriafol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

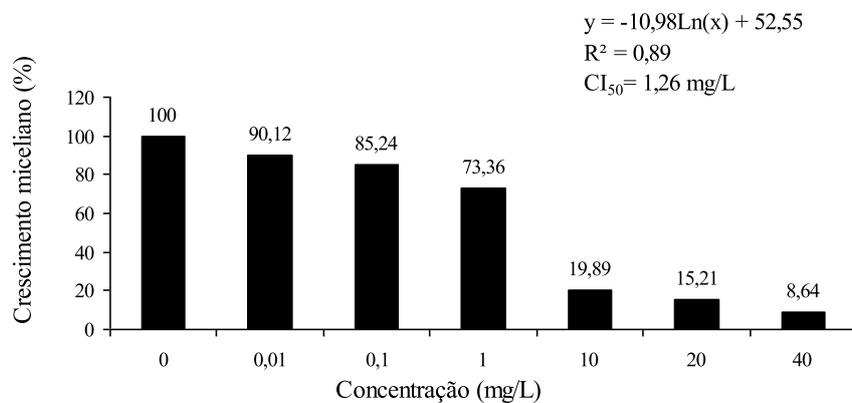


Figura 3: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 19/MS, em sete concentrações do fungicida flutriafol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

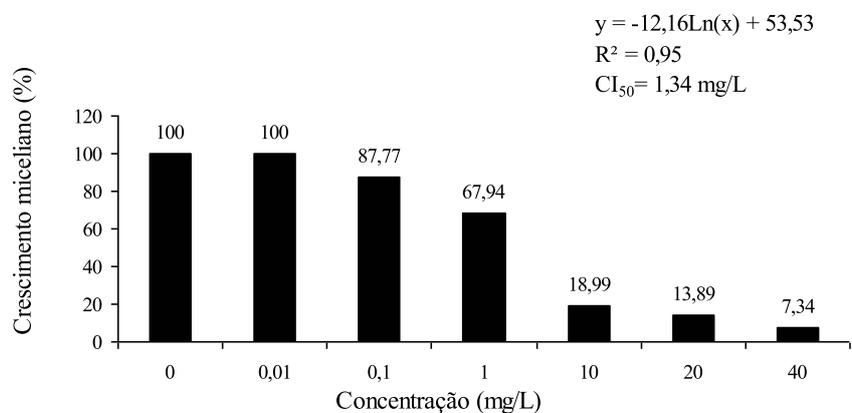


Figura 4: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 21/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida flutriafol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

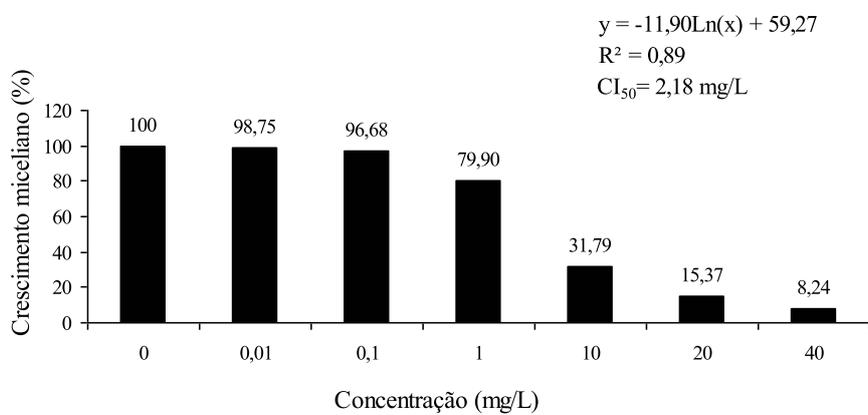


Figura 5: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 35/RO, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida flutriafol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

APÊNDICE 5 – Fungicida tebuconazol

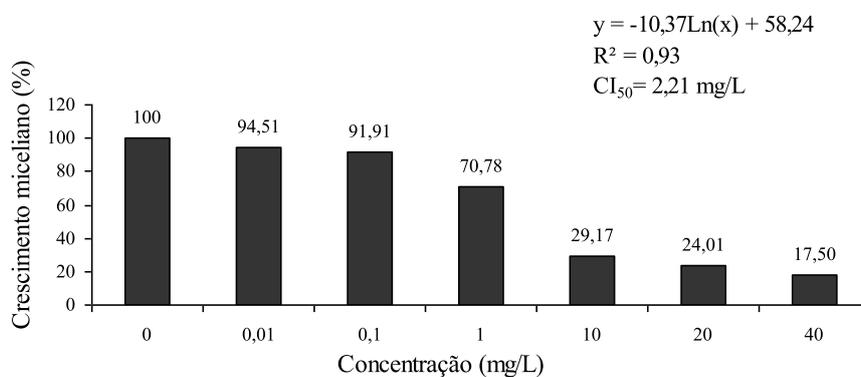


Figura 1: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 01/MG, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

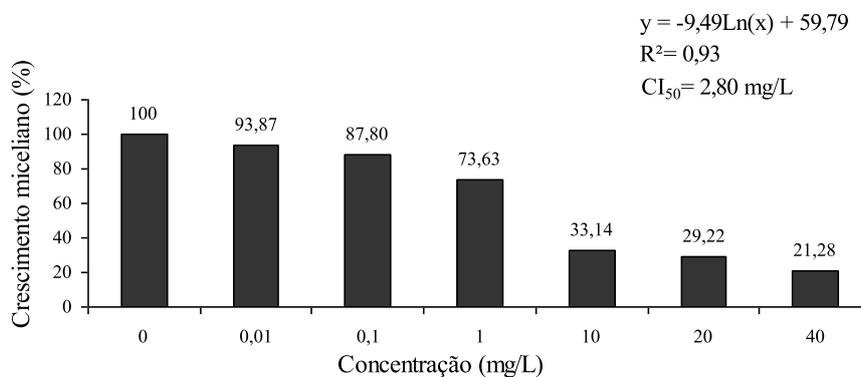


Figura 2: Crescimento miceliano de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 05/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

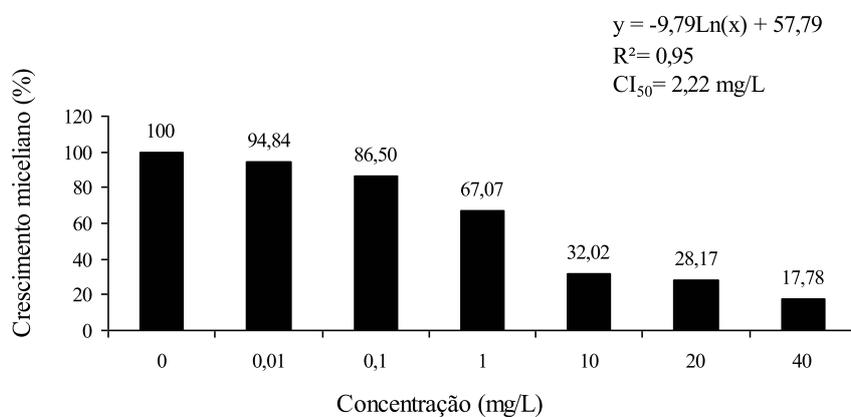


Figura 3: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 19/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

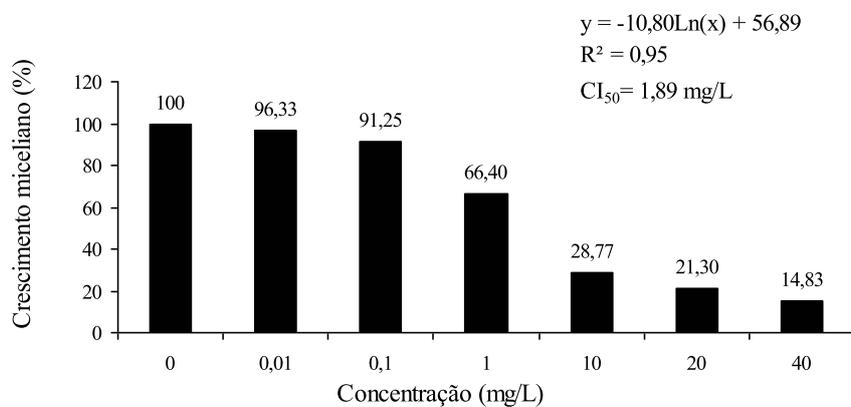


Figura 4: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 21/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol. Na equação, y representa à percentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

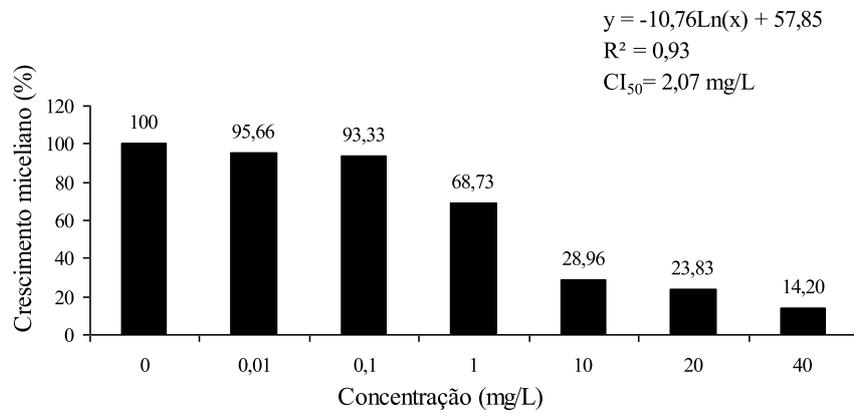


Figura 5: Crescimento miceliano (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 35/RO, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida tebuconazol. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

APÊNDICE 6 – Fungicida azoxistrobina

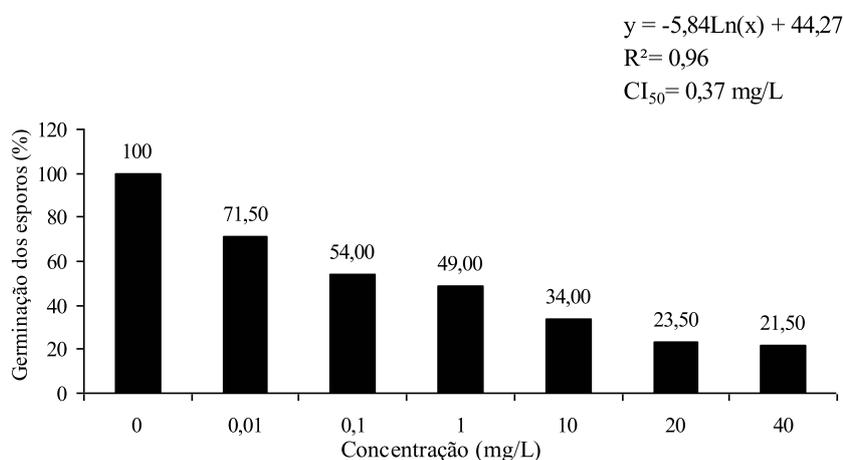


Figura 1: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 01/MG, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

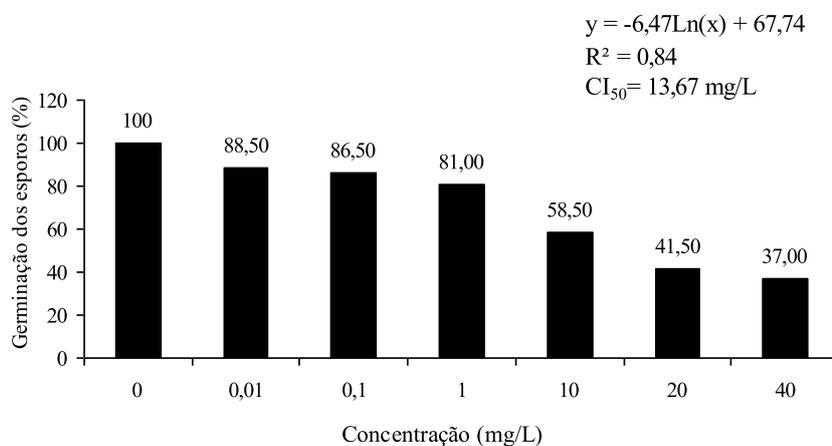


Figura 2: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 05/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

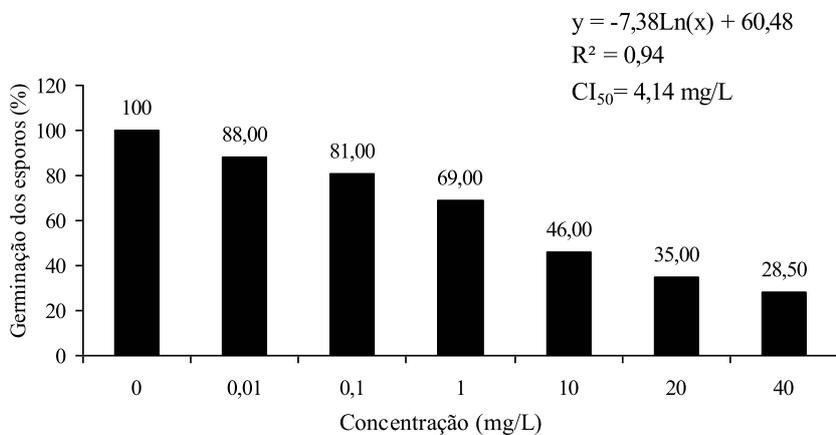


Figura 3: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 19/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

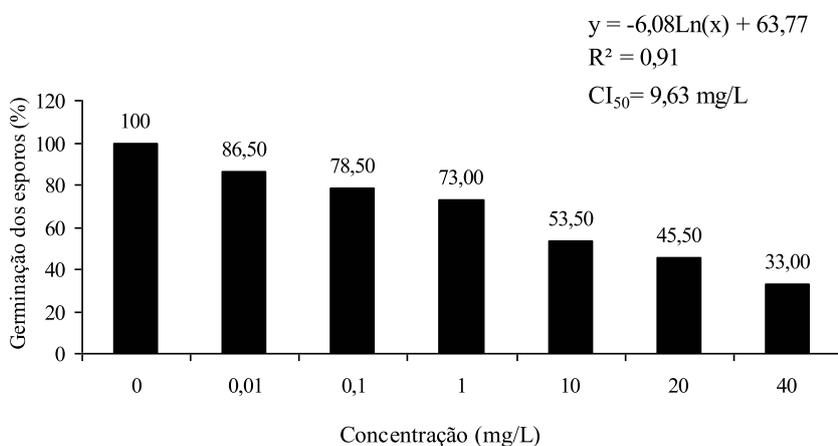


Figura 4: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 21/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

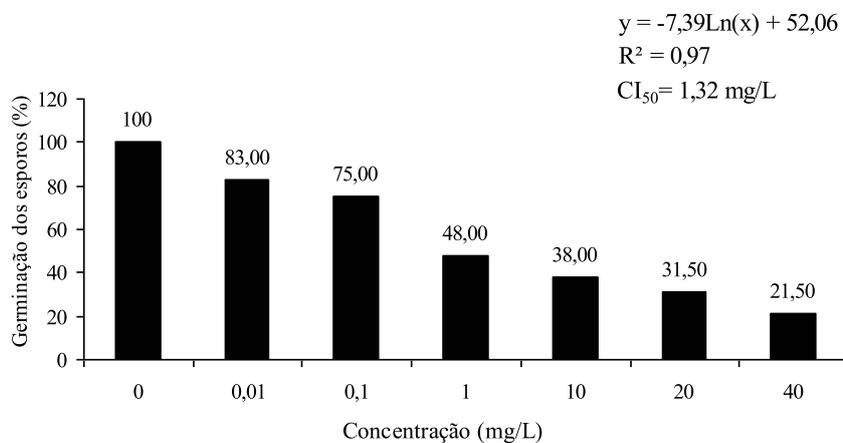


Figura 5: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 35/RO, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida azoxistrobina. Na equação, y representa a porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

APÊNDICE 7 – Fungicida piraclostrobina

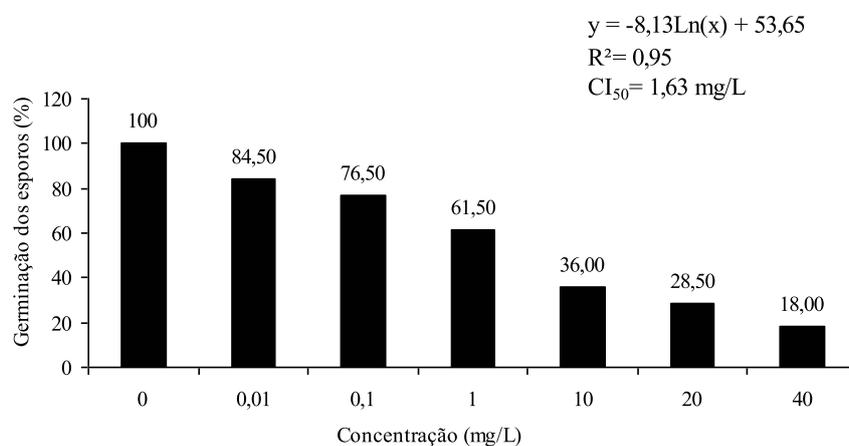


Figura 1: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 01/MG, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina. Na equação, y representa a porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

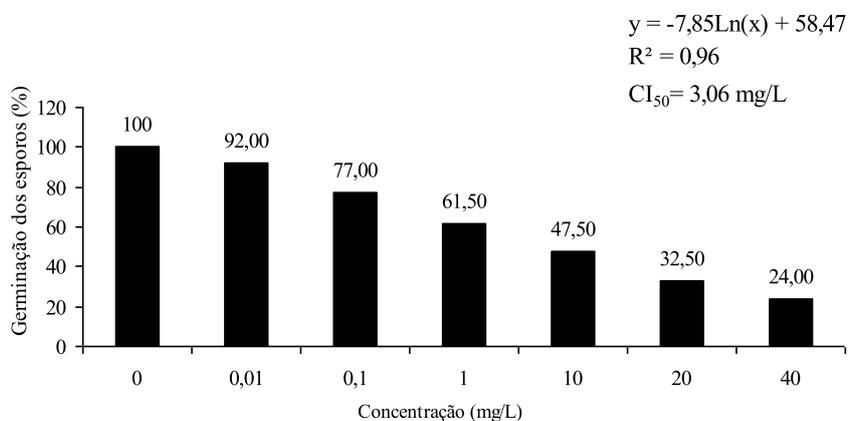


Figura 2: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 05/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina. Na equação, y representa a porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

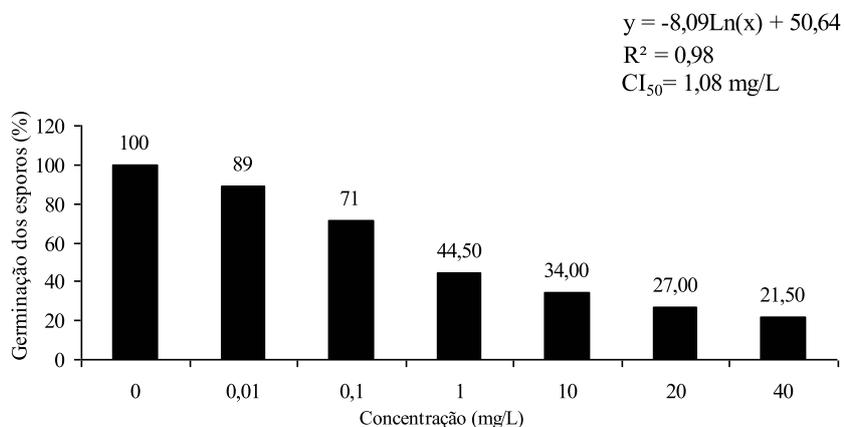


Figura 3: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 19/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

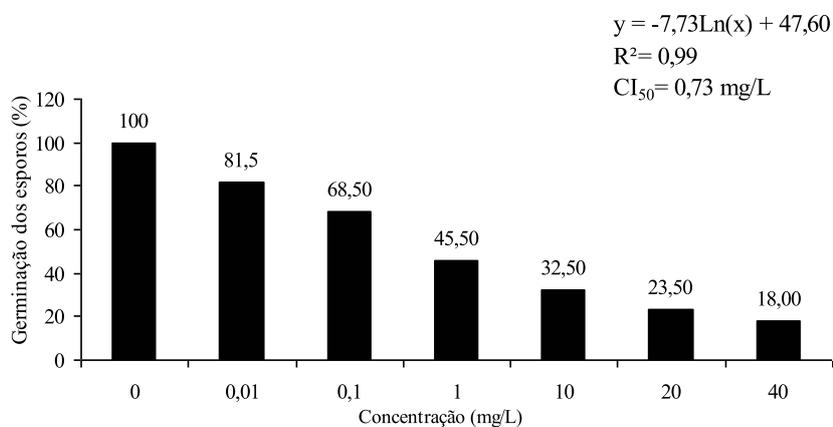


Figura 4: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 21/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

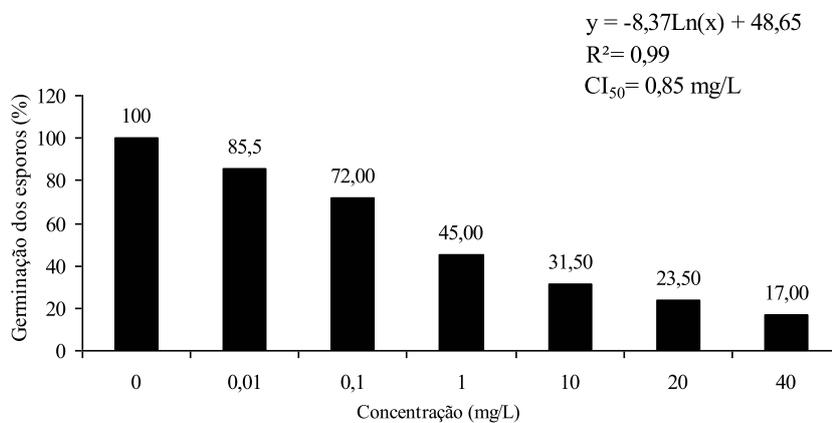


Figura 5: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 35/RO, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida piraclostrobina. Na equação, y representa a porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

APÊNDICE 8 – Fungicida picoxistrobina

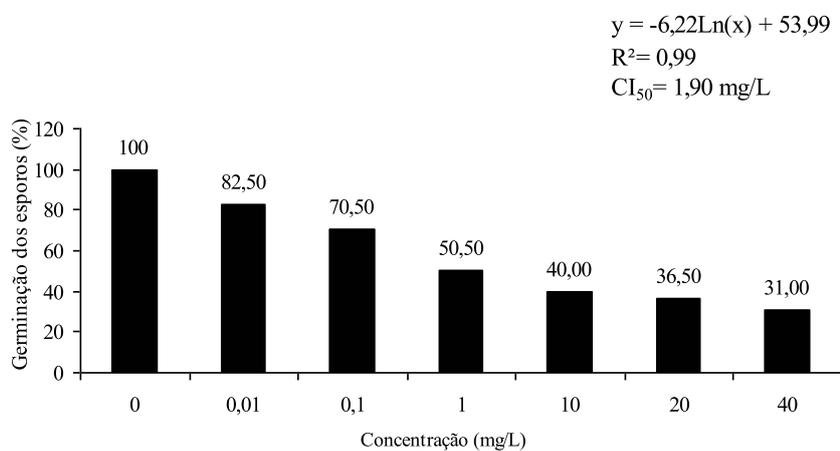


Figura 1: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 01/MG, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

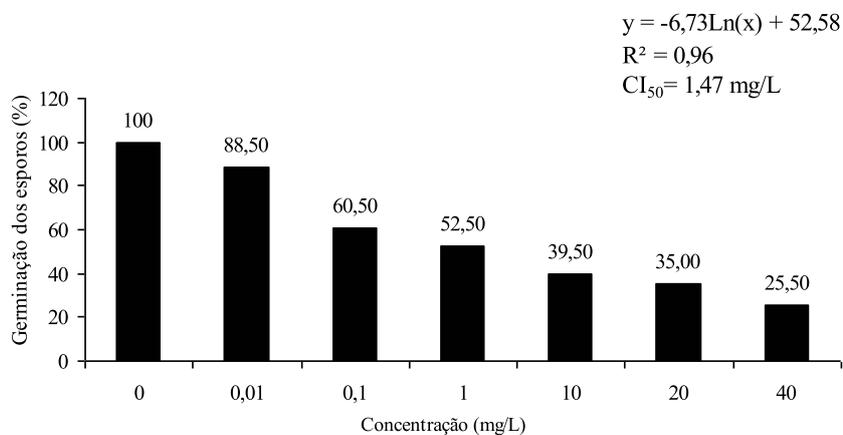


Figura 2: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 05/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

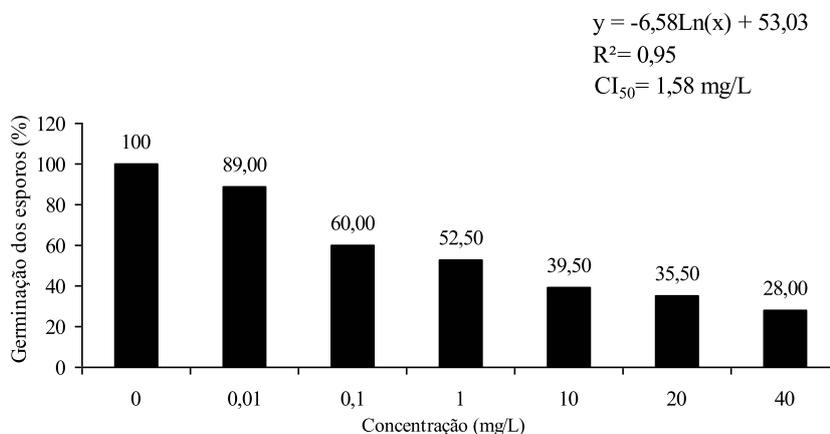


Figura 3: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 19/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

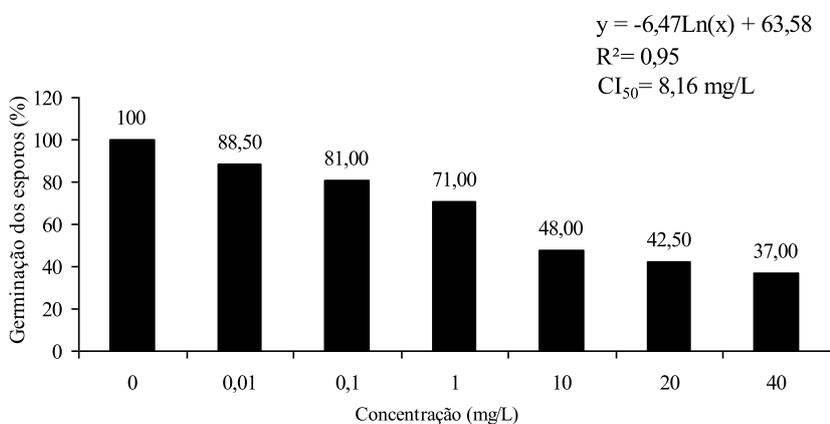


Figura 4: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassiicola*, para o isolado de soja 21/MS, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina. Na equação, y representa à porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos

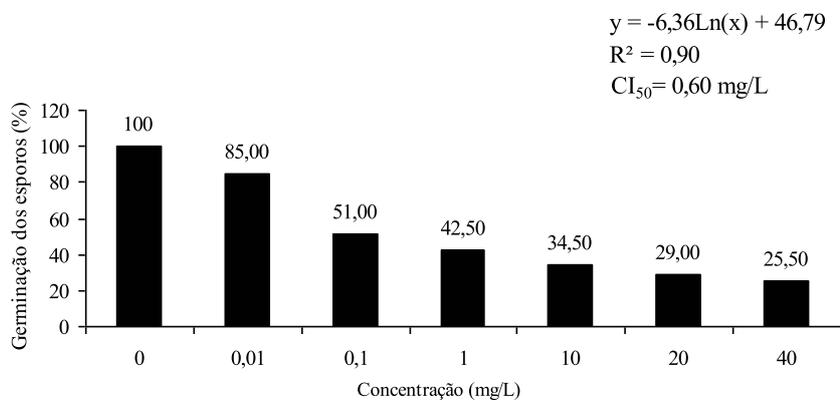


Figura 5: Germinação de esporos (%) de *Corynespora cassicola*, para o isolado de soja 35/RO, *in vitro*, em sete concentrações do fungicida picoxistrobina. Na equação, y representa a porcentagem de inibição da germinação e x a concentração do fungicida, médias dos dois experimentos