

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

**Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum truncatum* da soja a fungicidas**

Bruna dos Santos da Silva

Passo Fundo

2018

Bruna dos Santos da Silva

Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum truncatum* da soja a fungicidas

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

Orientadora:  
Dra. Carolina Cardoso Deuner

Passo Fundo

2018

CIP – Catalogação na Publicação

---

S586sSilva, Bruna dos Santos da  
Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum truncatum* da soja a fungicidas/Bruna dos Santos da Silva. – 2018.  
[109] f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Profª. Dra. Carolina Cardoso Deuner.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

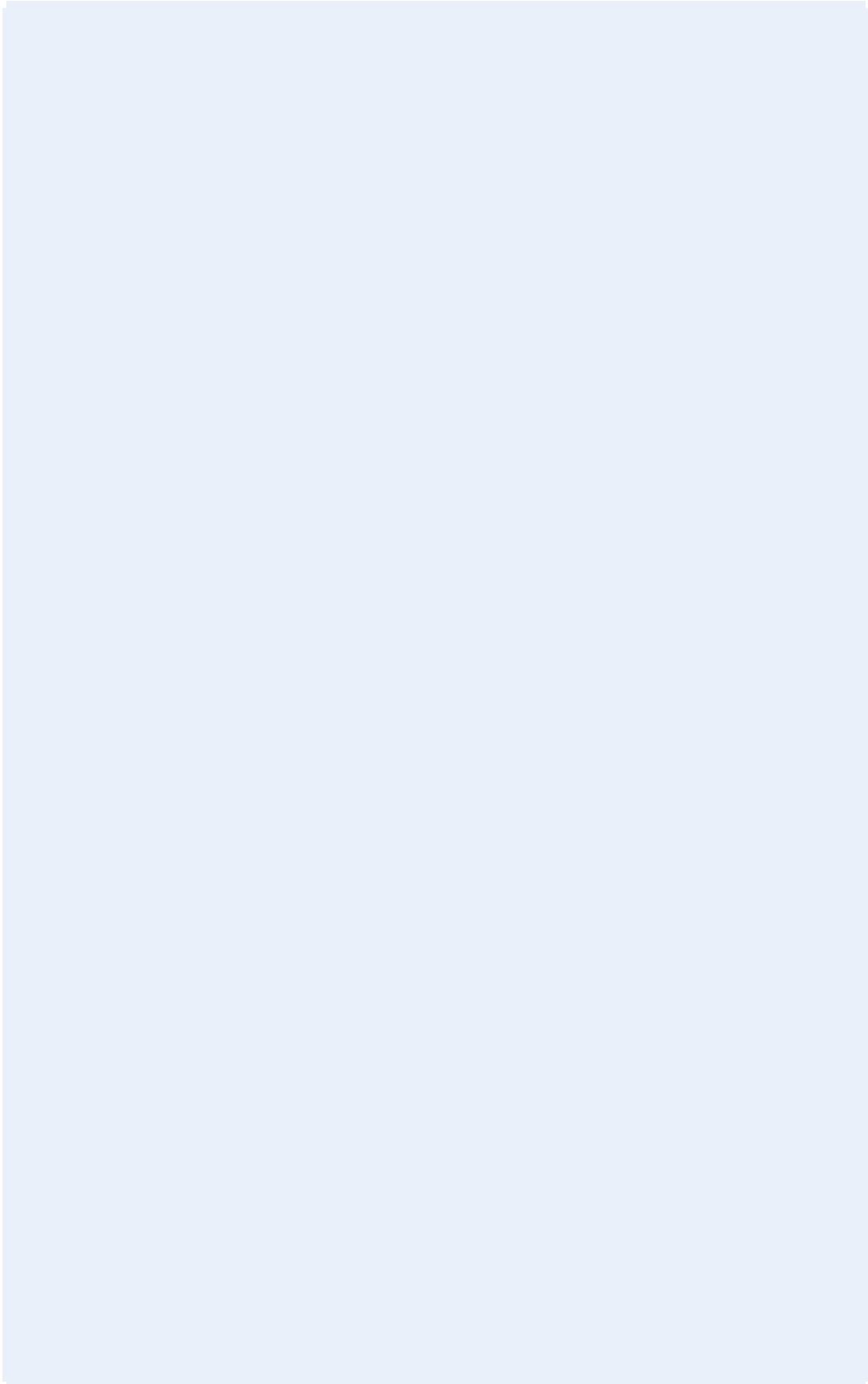
1. Plantas – Efeito dos fungicidas. 2. Soja – Antracnose. 3. Soja – Doenças e pragas. 4. Fungos. I. Deuner, Carolina Cardoso, orientadora. II. Título.

CDU: 633.34

---

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

## **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**



## **DEDICATÓRIA**

Para meus pais, Jorge e Olga, para que ao lerem seus nomes sintam todo amor e carinho que sempre me dedicaram e para que saibam que fazem parte de cada conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, toda minha gratidão, fé e certeza de que todos os seus desígnios estão sobre a minha vida.

Aos meus pais, por todo o amor e todos os momentos de ensinamentos, pelos seus valores e princípios que embasaram os meus, por abdicarem para que eu pudesse ter a oportunidade de estudar e me apoiaram desde sempre em minha escolha por Agronomia. Amo vocês!

Ao meu noivo, por estar ao meu lado, dividir comigo os momentos difíceis, me apoiar incondicionalmente e ser meu melhor amigo. Minha família e amigos por me incentivarem e me auxiliar de alguma forma, em especial à Natália, que além da profissão, compartilha sua sinceridade, apoio e amizade.

À minha orientadora, Profa. Carolina Deuner, e ao Prof. Erlei Reis, aos quais tenho imensa admiração. Agradeço pela oportunidade e por todo conhecimento transmitido.

À toda a equipe e estagiários do Laboratório de Fitopatologia, obrigada pela ajuda, disponibilidade e amizade.

À CAPES e ao PPGAgro pela oportunidade de realizar o curso de mestrado e dessa forma, poder vivenciar tantas experiências.

## **EPIGRAFE**

“Geração vai e outra vem; mas a terra permanece para sempre.

Levanta-se o sol, e põe-se o sol, e volta ao seu lugar, onde nasce de novo.

O vento vai para o sul e faz o seu giro para o norte; volve-se, e revolve-se, na sua carreira, e retorna aos seus circuitos”.

(Eclesiastes 1: 4-6)

## RESUMO

Silva, Bruna dos Santos da. **Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum truncatum* da soja a fungicidas.** [109] f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*, é uma das doenças que reduzem a produção da soja. A dificuldade de controle da doença em algumas regiões pode ser atribuída à redução da sensibilidade do fungo aos fungicidas. Os objetivos da pesquisa foram determinar *in vitro* a fungitoxicidade e avaliar a sensibilidade de fungicidas de distintos mecanismos de ação, puros ou em mistura, a isolados de *C. truncatum*, provenientes de diferentes regiões produtoras de soja do país. Foi quantificada a fungitoxicidade de ingredientes ativos comparando dados da  $CI_{50}$  de isolados do fungo analisados por três métodos de regressão, com programas computacionais. Foram realizados dois experimentos: o primeiro determinou a fungitoxicidade de fungicidas a isolados do fungo *in vitro*, utilizando dois isolados e 26 fungicidas (Capítulo I). O segundo foi a determinação da sensibilidade *in vitro* de 28 isolados do fungo a seis fungicidas (Capítulo II). O capítulo III relata o cálculo da  $CI_{50}$  com diferentes programas computacionais a partir dos dados coletados no experimento I. Os experimentos foram em delineamento experimental inteiramente casualizado, delineamento de tratamentos do tipo bifatorial em quatro repetições. A metodologia utilizada foi a mesma para ambos os experimentos, com cinco concentrações finais de ingrediente ativo: 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 40 mg/L para determinar a fungitoxicidade (I) e 0,1; 1,0; 10, 40 e 100 mg/L para determinar a sensibilidade (II). No experimento I, o isolado CT6 apresentou a maior  $CI_{50}$  para o benzimidazol (IST) e menor para os multissítios, enquanto para CT21, a maior foi para a estrobilurina (IQe) e a menor para o benzimidazol (IST). Ocorreu variabilidade entre os valores de  $CI_{50}$  para os dois isolados, indicando que a origem influenciou a sensibilidade do fungo. Para o experimento II a mistura de ingredientes ativos azoxistrobina + benzovindiflupir foi a que apresentou menor  $CI_{50}$ , enquanto o mancozebe apresentou a maior. De acordo com a região, Bahia e Mato Grosso apresentaram as menores  $CI_{50}$  e Rio Grande do Sul e isolados sem identificação apresentaram as mais altas. A sensibilidade do fungo varia de acordo com a origem, ingrediente ativo e mecanismos de ação. O controle do fungo irá alterar-se de acordo com o ambiente e fungicida. Para o capítulo III, os três programas estatísticos Microsoft Excel, RStudio e Infostat podem ser utilizados no cálculo da  $CI_{50}$ , porém para isolados que apresentam baixa sensibilidade o valor determinado pelo programa RStudio demonstrou melhor desempenho. Os programas Microsoft Excel e Infostat tenderam a determinar valores maiores da  $CI_{50}$  do que RStudio. O monitoramento da sensibilidade do fungo deve ser realizado para orientar o controle da doença nas populações do fungo e identificar qual a melhor opção de controle químico.

Palavras-chave: 1. Antracnose. 2. *Glycine max*. 3. Ingredientes ativos. 4. Mecanismos de ação. 5. Soja.



## ABSTRACT

Silva, Bruna dos Santos da. **Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* isolates from soybean to fungicides.** [109] f. Dissertation (Masters in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

Soybean anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum truncatum*, is one of the diseases that reduce crop yield. The difficulty to control the disease in some regions can be attributed to the reduction of fungus sensitivity to fungicides. The objectives of this research were to determine *in vitro* the fungitoxicity of different mechanisms of action, pure or in mixture, to isolates of *C. truncatum*, from different soybean producing regions of the country. The fungitoxicity of active ingredients was quantified by comparing the IC<sub>50</sub> data from fungus isolates analyzed by three regression methods, with computational programs. Two experiments were carried out: the first determining *in vitro* the fungitoxicity of fungicides to the fungus isolates, using two isolates and 26 fungicides (Chapter I). The second was the *in vitro* sensitivity determination of 28 fungus isolates to six fungicides (Chapter II). Chapter III reports the IC<sub>50</sub> calculation with different computational programs from the data collected in experiment I. The experiments were carried out in a completely randomized experimental design, designing bifactorial type treatments in four replicates. The methodology used was the same for both experiments, with five final concentrations of active ingredient: 0.01; 0.1; 1.0; 10 and 40 mg / L to determine fungitoxicity (I) and 0.1; 1.0; 10, 40 and 100 mg / L to determine the sensitivity (II). In the experiment I, the CT6 isolate presented the highest IC<sub>50</sub> for benzimidazole (STI) and smaller for the multisite, while for CT21 the largest was for strobilurin (QoI) and the lowest for benzimidazole (STI). There was variability between the IC<sub>50</sub> for the two isolates, indicating that their origin showed differences in the fungus sensitivity. For experiment II the active ingredient mixture azoxystrobin + benzovindiflupir was the one with the lowest IC<sub>50</sub>, while the mancozeb showed the highest. According to the region, Bahia and Mato Grosso presented the smallest IC<sub>50</sub> and isolates without identification, from Rio Grande do Sul, the highest. The sensitivity of the fungus varies according to the origin, active ingredient and mechanisms of action. The fungus control will change according to the environment and fungicide. For Chapter III, the three statistical programs Microsoft Excel, RStudio and Infostat can be used for IC<sub>50</sub> calculation, but for isolates with low sensitivity the value determined by the RStudio program showed better performance. The Microsoft Excel and Infostat programs tended to determine higher IC<sub>50</sub> values than RStudio. Monitoring the fungus sensitivity should be performed to guide disease control in fungus populations and identify the best chemical control option.

Key words: 1. Anthracnose. 2. *Glycine max.* 3. Active ingredients. 4. Mechanisms of action. 5. Soybean.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1	<i>Antracnose da soja</i>	15
2.1.1	Etiologia e sintomatologia	15
2.1.2	Sinais do fungo	16
2.1.3	Manejo integrado	18
2.1.4	Controle químico	19
2.2	<i>Resistência de fungos a fungicidas</i>	21
2.3	<i>Métodos para determinação da CI<sub>50</sub></i>	22
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I</b>	<b>24</b>
3.1	<i>Resumo</i>	24
3.2	<i>Introdução</i>	24
3.3	<i>Material e Métodos</i>	27
3.4	<i>Resultados</i>	30
3.5	<i>Discussão</i>	35
3.6	<i>Conclusões</i>	37
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>38</b>
4.1	<i>Resumo</i>	38
4.2	<i>Introdução</i>	38
4.3	<i>Material e Métodos</i>	40
4.3.1	Patogenicidade de <i>Colletotrichum truncatum</i> à soja	42
4.3.2	Determinação da sensibilidade de isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> a fungicidas <i>in vitro</i>	43
4.4	<i>Resultados</i>	45
4.4.1	Patogenicidade de <i>Colletotrichum truncatum</i> à soja	45
4.4.2	Determinação <i>in vitro</i> da sensibilidade de isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> a fungicidas	46
4.5	<i>Discussão</i>	55
4.5.1	Patogenicidade de <i>Colletotrichum truncatum</i> à soja	55
4.5.2	Determinação <i>in vitro</i> da sensibilidade de isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> a fungicidas	55
4.6	<i>Conclusões</i>	59

<b>5</b>	<b>CAPÍTULO III</b>	<b>61</b>
5.1	<i>Resumo</i>	61
5.2	<i>Introdução</i>	61
5.3	<i>Material e Métodos</i>	63
5.4	<i>Resultados</i>	65
5.5	<i>Discussão</i>	74
5.6	<i>Conclusões</i>	76
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>95</b>
	<i>Apêndice I - Determinação a partir dos valores de <math>CI_{50}</math> de dois isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> para diferentes fungicidas. Passo Fundo – 2016</i>	96
	<i>Apêndice II - Determinação da <math>CI_{50}</math> para isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> provenientes de diferentes regiões produtoras de soja a diferentes fungicidas. Passo Fundo – 2017</i>	101

## 1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma espécie de relevância econômica em todo mundo, sendo considerada umas das principais comódites agrícolas. Contudo, há inúmeros fatores que podem comprometer o alto rendimento da cultura como clima, solo (SIVARAJAN et al., 2018) e, principalmente doenças, dentre elas a antracnose (RAMOS et al., 2010).

A antracnose foi citada pela primeira vez em 1917, na Coréia e, desde então, foi relatada nas regiões temperadas de produção de soja (TOCHETTO et al., 1961). A doença está associada, principalmente, à espécie de fungo *Colletotrichum truncatum* (DAMM et al., 2009), descrita pela primeira vez por Andrus e Moore (1935) e, em seu estado perfeito, classificado no gênero *Glomerella* (ARMSTRONG-CHO; BANNIZA, 2006).

A antracnose é uma das principais doenças da soja na região do Cerrado brasileiro, pois a cultura é suscetível à infecção em todos os estágios de desenvolvimento (ALMEIDA et al., 2005). A doença apresenta infecção latente, caracterizada na fase inicial com sintomas em plântulas emergidas apresentando necrose (cancros profundo nos cotilédones) e tombamento de plântulas, podendo evoluir para sintomas em estádios fenológicos avançados (SINCLAIR; SHURTLEFF, 1975), com necrose em hastes, folhas e vagens, incluindo abertura imatura e torção de vagens e germinação prematura de grãos (BACKMAN; WILLIAMS; CRAWFORD, 1982; REIS; CASA; REIS, 2012), sendo que as sementes infectadas e os restos culturais são fontes iniciais do inóculo da doença (MANANDHAR; HARTMAN, 1999).

Embora não existam cultivares de soja comerciais com resistência tal que evite danos econômicos da antracnose, algumas fontes resistentes foram identificadas (COSTA et al., 2009). Portanto, o controle químico é importante alternativa utilizada

para o controle da doença. A aplicação de fungicidas na parte aérea pode prevenir a infecção do hospedeiro ou paralisar a colonização estabelecida (REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 33).

Os fungicidas podem ser classificados pelo mecanismo de ação e pelo grupo químico. Cada grupo químico possui um mecanismo de ação distinto, que é a forma pela qual um fungicida interfere numa função metabólica normal dos fungos, causando sua morte (BESTOR; ROBERTSON; MUELLER, 2011; FRAC, 2017).

Fungicidas pertencentes ao grupo químico estrobilurina, principalmente azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina são recomendados para aplicação em uma ampla gama de culturas para prevenir o desenvolvimento de doenças (BARTLETT et al., 2002) incluindo a antracnose, *Colletotrichum* spp.. Tem sido citado que a utilização de difeconazol, trifloxistrobina, azoxistrobina + difeconazol e piraclostrobina pode resultar em controle de até 93% da doença. Essa informação é confirmada em estudos realizados no Brasil, utilizando azoxistrobina e piraclostrobina apontam para a redução na incidência da antracnose em soja (PICININI; FERNANDES, 2000; RAVA, 2002).

Contudo, um dos fatores limitantes no controle químico de doenças é o desenvolvimento da resistência de fungos aos fungicidas. Resistência consiste em uma alteração herdável e estável quando aplicado um produto, gerando redução da sensibilidade (EUROPEAN, 1988). Para espécies de *Colletotrichum*, a resistência já foi relatada à benzimidazol, estrobilurina e triazol causando frequentemente à redução da eficácia desses fungicidas (CHUNG et al., 2006; PERES et al., 2004; WONG; MIDLAND, 2007).

Investigações sobre a redução da sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* spp. a fungicidas mostra diferenças, pois isolados apresentam redução na sensibilidade ao benomil e com taxas mais lentas de crescimento entre isolados, mesmo comportamento observado para captana, triadimenol (GREER et al., 2011), tiabendazol (RAMDIAL; HOSEIN; RAMPERSAD, 2016) e carbendazim (SOUZA, 2009) e

azoxistrobina (CALZADA et al., 2015). Com tantas informações divergentes, deve ser feito o monitoramento da sensibilidade do fungo, determinado através da concentração da substância que inibe 50% (CI<sub>50</sub>) o crescimento micelial ou a germinação de esporos viáveis (REIS; DEUNER; ZANATTA, 2015).

Diante da importância da antracnose na cultura da soja, é necessário determinar a sensibilidade de isolados do fungo e a fungitoxicidade de fungicidas com diferentes mecanismos de ação. A informação obtida no presente estudo é essencial para monitorar a efetividade do manejo aplicado para o controle desta doença e verificar a variação na sensibilidade de isolados de *C. truncatum*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade de isolados de *C. truncatum*, proveniente de diferentes regiões produtoras de soja, a fungicidas de distintos mecanismos de ação, isolados ou em misturas. O objetivo específico foi analisar a CI<sub>50</sub> calculada por três métodos de regressão com programas computacionais.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Antracnose da soja**

A antracnose da soja é considerada uma das doenças mais comuns da cultura com incidência e os danos elevados. Está presente em todas as regiões de cultivo de soja, causando danos em áreas do Cerrado brasileiro, particularmente, em lavouras conduzidas em monocultura e plantio direto. O patógeno ataca todos os órgãos da planta, em todos os estádios de desenvolvimento (SILVA et al., 2017), induzindo a sintomas que incluem cancos em cotilédones, tombamento de plântulas, necrose em haste, vagens, pecíolos e folhas (ALMEIDA et al., 2005, p. 650; GALLI; PANIZZI; VIEIRA, 2007).

A doença foi constatada pela primeira vez em 1917, por Takimoto, em Suigem, na Coréia, e o organismo causador foi identificado por Hemi, como *Colletotrichum glycines* Hori. No Brasil, foi descrita pela primeira vez por Tochetto et al. (1961), que identificou como agente causal o fungo *C. truncatum* (REIS; CASA; REIS, 2012, p. 191-192).

#### **2.1.1 Etiologia e sintomatologia**

O agente causal da antracnose da soja em sua fase anamórfica (reprodução assexual) é denominado de *C. truncatum*, pertencente ao Reino Fungi, Filo Deuteromycota, Classe Deuteromicetos, Subclasse Coelomicetes, Ordem Melanconiales e Família Melanconiacea. Em sua fase teleomórfica (reprodução sexual), o fungo é classificado como *Glomerella truncata* Armstrong & Banniza, classificado ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Pyrenomycetes, Ordem Phyllacorales e Família Phyllachoraceae (MYCOBANK, 2017). O agente patogênico é necrotrófico colonizando e matando as células do hospedeiro (VAN KAN, 2006).

A doença apresenta infecção latente, que é caracterizada pela penetração do patógeno em plantas jovens, onde permanece dormente nos tecidos da planta, antes que os sintomas da doença se desenvolvam nos estádios finais da cultura. Podem ser observados sintomas em plântulas que apresentam necrose em um ou nos dois cotilédones, tombamento de plântulas, além destes, outros sintomas podem ser notados em diferentes estádios fenológicos (COSTA et al., 2009; PRUSKY et al., 2013; SHAW et al., 2016).

Os sintomas observados no final de ciclo da cultura geralmente se desenvolvem em hastes e vagens, durante ou após a senescência, como lesões negras irregulares e necrose de pecíolo e folhas, que são observados quando as folhas viram a face adaxial para baixo, formando sintoma chamado de “cajado de pastor”. Portanto, podem-se relacionar os danos como: morte em plântulas em pré e pós emergência e infecção latente nas hastes, vagens e folhas (ALMEIDA et al., 2005, p. 650; BACKMAN; WILLIAMS; CRAWFORD, 1982; MANANDHAR et al., 1985; SINCLAIR; SHURTLEFF, 1975; REIS; CASA; REIS, 2012, p. 194).

Além da soja, entre os hospedeiros de *C. truncatum* estão inclusas outras espécies de importância econômica como amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pimenta (*Capsicum annuum* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão-de-corda (*Vigna sinensis* (L.) Savi), plantas ornamentais, como trevo-amarelo (*Melilotus alba* (L.) Pall), peperômia (*Peperomia magnoliifolia* L.), de cobertura vegetal ou forrageiras, como *Crotalaria juncea*, *spectabilis*, alfafa (*Medicago sativa* L.), trevo-branco (*Trifolium repens* L.), ervilhaca (*Vicia sativa* L.), e plantas daninhas, como tiririca (*Cyperus rotundus* L.) e flor-roxa (*Limonium* spp.) (CANNON et al., 2012; Q-BANK, 2017; SHARMA; KAUSHAL, 1999).

### **2.1.2 Sinais do fungo**

Na fase anamórfica a frutificação do fungo *C. truncatum* é do tipo acérvulo, sobre os tecidos infectados, dotados de inúmeras setas pigmentadas e septadas que medem de 30 a 200 µm de comprimento por 4 a 6 µm de largura. Eventualmente pode



ocorrer a formação de conidióforos ramificados próximo à base, células conidiogênicas cilíndricas, hialinas e fialídicas, conídios unicelulares hialinos, cilíndricos ou falcados, com apressório pigmentado na germinação. Os conídios apresentam comprimento de 20 a 22  $\mu\text{m}$  por 3,75 a 4,5  $\mu\text{m}$  de largura, são fortemente curvados, fusiformes com as extremidades afiladas. Os apressórios são abundantes, medindo de 8 a 11,5  $\mu\text{m}$  de comprimento por 6,5 a 8  $\mu\text{m}$  de largura, clavados ou circulares, formando cadeias ramificadas (DAMM et al., 2009; JAGTAP; SONTAKKE, 2009; SINCLAIR; SHURTLEFF, 1975; SUTTON, 1992).

Na fase telomórfica o fungo *G. truncata* produz peritécios que se projetam pela epiderme em um estroma, produzido no córtex, em par ou maior número, membranosos, globosos e com tamanho variando de 180 a 340  $\mu\text{m}$ . A asca é oblonga e clavada, medindo de 38 a 106 x 7 a 13,5  $\mu\text{m}$ . No interior da asca, são produzidos oito ascósporos hialinos, unicelulares e ligeiramente curvados, medindo de 13 a 43 x 4 a 6  $\mu\text{m}$ . Quando atingem a maturação, são ejetados à força do peritécio (DAMM et al., 2009; SINCLAIR; SHURTLEFF, 1975).

A germinação de esporos, formação de apressórios e crescimento micelial de *C. truncatum*, ocorrem com temperatura na faixa de 25 a 30 °C. Quando o patógeno é exposto ao período de molhamento de 32 horas, a temperatura ideal para desenvolvimento dos sintomas é em torno de 25 a 30 °C e o tamanho da lesão é maior, no entanto, é possível visualizar sintomas com período de molhamento menor, em torno de 8 horas, porém, o desenvolvimento de lesões ocorre com temperatura mínima de 30 °C (JAMADAR, 2015; OH; KIM, 2003). A função matemática de dano, normalizada para 1000 kg/ha, foi  $R = 1000 - 18,92 IV$ , com  $R^2 = 0,8485$ , onde R é o rendimento de grãos e IV a incidência em vagens (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016), porém, maior número de informações sobre danos associado à doença ainda é escasso.

### 2.1.3 Manejo integrado

O manejo integrado de doenças consiste na utilização de todas as técnicas disponíveis para manter a população de patógenos abaixo do limiar de dano econômico e minimizar os efeitos deletérios ao meio ambiente (NAS, 1969). Dentre as estratégias de manejo, destaca-se o controle integrado, que é um sistema de manejo de organismos nocivos que utiliza todas as técnicas e métodos apropriados de maneira mais compatível possível para manter as populações de organismos nocivos em níveis abaixo daqueles que causem dano econômico (FAO, 1968).

As estratégias de manejo da antracnose são controle genético (cultivares resistentes), controle cultural (rotação de culturas) e controle químico (tratamento de sementes e parte aérea) (ALMEIDA et al., 1997, p. 605). O controle genético para a antracnose na cultura da soja em geral, não é eficiente em estádios iniciais de desenvolvimento, porém, alguns trabalhos mostram que quando a infecção do patógeno ocorre em estádios finais há o aumento na resistência, ou seja, plantas juvenis mostram-se mais suscetíveis à infecção, mostrando uma variação genética quanto à resistência. Há trabalhos que mostram a reação de planta adulta na cultivar “Emgopa 316”, porém apresentam suscetibilidade na fase de plântula, ao contrário do que pode ser observado para as cultivares “Anta 82” e “MSOY 8400”, que demonstram reação de resistência tanto em plântula quanto em planta adulta (COSTA et al., 2006; COSTA et al., 2009).

O controle cultural da antracnose pela rotação de cultura é eficiente para a redução do inóculo presente na palhada, pois o fungo sobrevive saprofiticamente nos restos culturais da soja, que podem levar até 35 meses para serem totalmente decompostos. Porém, deve ser utilizado como manejo integrado, pois o fungo também pode ser transmissão via sementes (REIS et al., 2011; REIS; CASA; REIS, 2012, p. 193).

#### 2.1.4 Controle químico

A utilização do tratamento de sementes com fungicidas como manejo da antracnose em soja promove e melhora o desenvolvimento e estrutura das plantas, além de garantir a germinação e emergência. Há trabalhos que apontam eficiência no controle da doença com a utilização de fungicidas, como carbendazim + tiram, fludioxonil + mefenoxan e tiabendazol + tiram. Além do incremento na uniformidade de germinação, o tratamento de sementes controla o tombament na fase inicial de desenvolvimento da cultura (GOULART, 2006; OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2009).

A aplicação de fungicidas na parte aérea visa prevenir à infecção do hospedeiro ou paralisar a colonização que já tenha se estabelecido e, além destes, visa à redução de fontes de inóculo. O controle deve levar em conta todos os patossistemas na cultura além do estágio fenológico da cultura afetada, os danos causados pelo agente causal, o custo da aplicação do controle químico e o espectro de ação do fungicida (REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 141).

Os fungicidas podem ser classificados através do mecanismo de ação e grupo químico. O mecanismo de ação é a forma pela qual um fungicida interfere na função metabólica normal dos fungos, causando sua morte. Os mecanismos de ação de um grupo químico não se alteram ao longo do tempo (BESTOR; ROBERTSON; MUELLER, 2011; FRAC, 2017).

O mecanismo de ação dos fungicidas do grupo químico triazol age como inibidores da biossíntese de ergosterol, que fazem parte de um subconjunto, os inibidores da desmetilação do C14 (IDM). Esses fungicidas inibem a formação da membrana celular. Os ingredientes ativos do grupo químico triazol mais comuns são propiconazol, prothioconazol, tebuconazol e ciproconazol, e classificados como médio risco para desenvolvimento da resistência (FRAC, 2017; REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 58; WISE et al., 2009).

O grupo de compostos químicos denominado de estrobilurina, compõem o grupo dos inibidores de quinona externa (IQe), com toxicidade resultante da inibição da cadeia respiratória no Complexo III, impedindo na cadeia bioquímica a transferência de elétrons bloqueando a respiração do patógeno. Os ingredientes ativos do grupo químico estrobilurina mais comuns são a azoxistrobina, cresoxim metílico, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina. Essas são consideradas com alto risco ao desenvolvimento da resistência, pois não é necessário que haja um elevado número de mutações (FRAC, 2017; PEREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009; REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 65).

A carboxamida exerce ação fungicida no complexo II (ou complexo succinato desidrogenase) da cadeia de transferência de elétrons na mitocôndria e inibição da oxidação da enzima succinato desidrogenase (ISDH). Os principais fungicidas são a fluxapiroxada, benzovindiflupir e bixafeno. Essas são classificadas de médio a alto risco para desenvolvimento da resistência (FRAC, 2017; REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 65).

O mecanismo de ação do benzimidazol é sobre a integridade da tubulina (IST). Os microtúbulos são hélices alternadas que estão presentes na formação do fuso e na separação dos cromossomos durante a divisão celular. Os compostos interferem na mitose, na divisão celular da metáfase, sendo o fuso mitótico destruído e os núcleos filios fracassam, ocasionando a morte celular. Os principais fungicidas desse grupo são o carbendazim, tiabendazol e tiofanato metílico. Esses são classificados como alto risco para desenvolvimento da resistência, como confirmam alguns trabalhos em é relatada a ocorrência da perda da sensibilidade do fungo a fungicidas deste grupo químico (CALZADA et al., 2015; FRAC, 2017; GHINI; KIMATI, 2000, p. 49; REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 69).

Os fungicidas que apreentam interferência generalizada nas funções celulares ou atividade multissítio, provocam ação múltipla dos compostos em diferentes grupos enzimáticos e metabólitos vitais. Atuam em diferentes processos bioquímicos simultaneamente, resultando principalmente em efeitos na respiração celular,

permeabilidade da membrana e atuação das enzimas, em diferentes de forma protetora contra infecções, e desempenhando ação curativa ou erradicante contra colônias fúngicas estabelecidas. Os fungicidas mais comumente utilizados são mancozebe (ditiocarbamatos), clorotalonil (cloronitrilas), cúpricos e sulfurados. São classificados como baixo risco para desenvolvimento de resistência, devido aos múltiplos sítios de atuação (FRAC, 2017; RODRIGUES, 2006, p. 205).

## **2.2 Resistência de fungos a fungicidas**

O desenvolvimento da resistência do fungo a fungicidas é uma alteração herdável e estável em resposta a aplicação de um produto acarretando na redução da sensibilidade (EUROPEAN, 1988). Por outro lado, a insensibilidade caracteriza a completa falta de resistência, e não deve ser utilizada como sinônimo de resistência (GHINI; KIMATI, 2000, p. 20-21).

A resistência é classificada como cruzada quando ocorre a dois ou mais fungicidas, pertencentes ao mesmo mecanismo de ação, causada pelo mesmo fator genético. A resistência múltipla é aquela desenvolvida para fungicidas com diferentes mecanismos de ação, mas determinada por fatores genéticos distintos, portanto, pertencentes a diferentes mecanismos de ação (GHINI; KIMATI, 2000, p. 21).

A fungitoxicidade é conceituada como a propriedade de uma substância química apresenta em relação à toxicidade a fungos em baixas concentrações, diferente de sensibilidade que demonstra a reação do fungo ao fungicida, ou seja, a fungitoxicidade é um aspecto relacionado à molécula e a sensibilidade à espécie o fungo (REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 29).

Os parâmetros para medir a sensibilidade do fungo a uma substância tóxica ou a fungitoxicidade de um produto químico podem ser determinados através da CI (concentração inibidora), onde para cada um dos parâmetros é atribuído o valor 50, referindo-se a concentração da substância que inibe 50% do crescimento micelial ou da germinação de esporos viáveis (FURLAN; SCHERB, 2007; REIS; REIS; CARMONA,

2010, p. 27; REIS; DEUNER; ZANATTA, 2015; RUSSEL, 2004). Para as avaliações, são comumente utilizados o crescimento micelial e a germinação de esporos, para diferentes mecanismos de ação, dentre eles triazole estrobilurina (SANTANA; CLEBSCH; CARGNIN, 2014).

A determinação para que dada substância seja considerada tóxica ao fungo (fungicida), deve possuir valor da concentração com capacidade de inibição da sobrevivência de 50% da população patogênica ( $CI_{50}$ ) inferior a 50 mg/L. Num fungicida que é considerado como altamente tóxico, o valor da  $CI_{50}$  não deve exceder 1 mg/L. Já nos fungicidas considerados com toxicidade moderada, a  $CI_{50}$  deve estar no intervalo de 1 a 50 mg/L (EDGINGTON; KLEW, 1971).

De acordo com estudo utilizando fungicidas em mistura comercial de ingredientes ativos entre triazol e estrobilurina e carbendazim (isolado) a  $CI_{50}$  de *C. truncatum* foi de 1,05 mg/L para epoxiconazol + piraclostrobina (triazol + estrobilurina), 2,6 mg/L para ciproconazol + trifloxistrobina (triazol + estrobilurina), 4,95 mg/L para tebuconazol (triazol), 9,9 mg/L para ciproconazol + azoxistrobina (triazol + estrobilurina) e 100 mg/L para carbendazim (benzimidazol) (SOUZA, 2009).

No entanto, essas concentrações necessitam ser revisadas pois os resultados quanto à eficiência de fungicidas divergem, principalmente, em relação ao grupo químico benzimidazol, como relatado em estudo de Pesqueira, Bacchi e Gavassoni (2016), em que o princípio ativo carbendazim foi eficiente no controle da antracnose, tanto em incidência em plantas quanto em sementes. Dessa forma, o monitoramento da  $CI_{50}$  deve ser realizado para quantificar o estado atual da sensibilidade do fungo.

### **2.3 Métodos para determinação da $CI_{50}$**

A sensibilidade do fungo a fungicidas determinada pela  $CI_{50}$  por meio da inibição do crescimento micelial, pode ser calculada por diferentes métodos, como regressão linear ou logística (LIANG et al., 2015). A comparação da  $CI_{50}$  independente do método utilizado já foi avaliada para outros patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*

(LI et al., 2015) e incluindo diferentes tipos de análises (JIANG; KOPP-SCHNEIDER, 2014).

Além dos diferentes métodos para calcular a  $CI_{50}$ , também são utilizados programas computacionais como InfoStat (ECHEVERRIA; GUTIÉRREZ; CARMONA, 2017; SALAZAR et al., 2012; YÁÑEZ; FRANCE, 2010), Microsoft Excel (ROSSI; REIS; BRUSTOLIN, 2015; ISHIZUKA, 2016 p. 11; KORKMAZ et al., 2017) e RStudio (HAGERTY et al., 2017; REHFUS et al., 2016; ARDUIM et al., 2012).

### 3 CAPÍTULO I

Fungitoxicidade de fungicidas *in vitro* a dois isolados de *Colletotrichum truncatum* da soja.

#### 3.1 Resumo

O uso de fungicidas sítio-específicos para controle da antracnose (*Colletotrichum truncatum*) e com várias aplicações/área leva à adaptação dos fungos aos mecanismos de ação. A dificuldade de controle da doença em algumas regiões pode ser atribuída à redução da sensibilidade do fungo aos fungicidas, determinada pela  $CI_{50}$ . Devido à importância da doença e à falta de informações sobre a sensibilidade do fungo, o objetivo desta pesquisa foi determinar *in vitro* a fungitoxicidade de fungicidas de distintos mecanismos de ação puros, ou em mistura, a isolados de *C. truncatum*, provenientes de diferentes regiões produtoras de soja. Foram utilizados dois isolados do fungo, com delineamento experimental inteiramente casualiado, com delineamento de tratamentos do tipo bifatorial, com dois isolados (CT6 e CT21) e 26 fungicidas. As unidades experimentais foram placas de Petri (79,4 mm de diâmetro) e quatro repetições. O isolado CT6 apresentou a maior  $CI_{50}$  média para benzimidazol (IST), com 38,61 mg/L e menor para multissítios, 19,08 mg/L. Para CT21, a maior foi 32,65 mg/L (IQe, estrobilurina) e a menor 0,0013 mg/L (IST, benzimidazol). A mistura comercial azoxistrobina + benzovindiflupir apresentou maior fungitoxicidade, com menor  $CI_{50}$  para os dois isolados do fungo. Ocorreu variabilidade entre os valores de  $CI_{50}$  para os dois isolados.

Palavras-chave: 1. Antracnose. 2. Carboxamida. 3. Estrobilurina. 4. *Glycine max*. 5. Triazol.

#### 3.2 Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma cultura de relevância econômica, sendo considerada umas das principais comódites agrícolas. Apesar de ser a principal espécie vegetal cultivada no país, há fatores que interferem no rendimento da cultura como clima, solo (SIVARAJAN et al., 2018), pragas, plantas daninhas e principalmente doenças e, dentre essas, a antracnose (RAMOS et al., 2010) causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W. D. Moore, agente causal da doença em vários hospedeiros (DAMM et al., 2009). A doença é considerada fator limitante na produção da soja, com função matemática de dano, normalizada para 1000 kg/ha, foi R



= 1000 - 18,92 IV, com  $R^2 = 0,8485$ , onde R é o rendimento de grãos e IV a incidência em vagens (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

Na busca por estratégias eficazes para controlar a doença, vários métodos têm sido utilizados como a resistência genética (COSTA et al., 2006), a produção de sementes sadias aliado ao tratamento com fungicidas e doses eficientes (OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2009) e a rotação de culturas (ADAMI et al., 2006). Porém, devido a não observância da rotação de cultura e a ausência de cultivares resistentes, tem-se destacado o controle químico. Poucos são os trabalhos publicados no Brasil sobre a fungitoxicidade de fungicidas à antracnose da soja, por isso, pouco se conhece sobre a fungitoxicidade dos principais grupos químicos atualmente em uso. Apesar disso, acredita-se que as aplicações de fungicidas têm auxiliado na redução dos danos causados pela antracnose (CARNIEL; MENOSSO; BALBINOT-JÚNIOR, 2014; PESQUEIRA; BACCHI; GAVASSONI, 2016).

A especificidade, que atribui maior eficiência a alguns fungicidas, é a principal responsável pelo desenvolvimento da redução da sensibilidade dos fungos (REIS; DEUNER; ZANATTA, 2015). No controle químico, deve-se levar em conta o dano causado pela doença, o custo da (s) aplicação (ões), a potência do fungicida, a dose, o momento das aplicações e o número de aplicações economicamente viáveis (REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 146).

Os principais fungicidas usados no controle das doenças em soja pertencem a cinco grupos químicos: triazol, estrobilurina, carboxamida, benzimidazol e não específicos (multissítio). Quanto ao mecanismo de ação são denominados inibidor da desmetilação (IDM), inibidor da quinona externa (IQe), inibidor da succinato desidrogenase (ISDH) e inibidor da síntese da tubulina (IST), interferência generalizada nas funções celulares (multissítio), respectivamente (FRAC, 2017; REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 58-70). Diferentemente da sensibilidade dos fungos, os mecanismos de ação de um grupo químico não se altera ao longo do tempo (BESTOR; ROBERTSON; MUELLER, 2011). Portanto, os fungicidas não alteram sua fungitoxicidade, mas tornam-se agentes selecionadores. No entanto, alguns grupos

químicos possuem alto risco quanto à seleção de populações de fungos resistentes como estrobilurina e carboxamida, enquanto outros apresentam risco médio, como triazol e benzimidazol e de baixo risco como multissítios (PEREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009; RODRIGUES, 2006). O parâmetro utilizado para avaliar a sensibilidade de um fungo é a concentração da substância que inibe 50% (CI<sub>50</sub>) do crescimento micelial ou da germinação de esporos viáveis (REIS; REIS; CARMONA, p. 27).

Na agricultura moderna, paralelamente ao controle químico, deveria ser feito o monitoramento da sensibilidade da população dos fungos que causam danos econômicos numa cultura, o que ainda ocorre esporadicamente no Brasil. O uso de fungicidas sítio-específicos numa grande área, e com muitas aplicações/área cedo ou tarde acarreta na adaptação dos fungos aos mecanismos de ação. Relatos de produtores e consultores técnicos sobre as dificuldades de controle da antracnose, tendo-se inclusive levantado a hipótese da redução da sensibilidade dos fungos aos fungicidas em uso. Dada a importância da antracnose, e à falta de informações sobre a sensibilidade do fungo agente causal aos fungicidas, é necessário determinar a fungitoxicidade de fungicidas a isolados de *C. truncatum*, provenientes de diferentes regiões produtoras de soja do Brasil. A informação obtida a partir desse estudo é essencial para monitorar a sensibilidade de isolados frente a fungicidas usados no manejo desta doença.

Formulou-se a hipótese de que a dificuldade de controle da doença em algumas regiões pode ser atribuída à redução da sensibilidade do fungo aos fungicidas usados em seu controle. Dessa forma, torna-se necessário determinar a fungitoxicidade de fungicidas através da concentração *in vitro* que iniba 50% o crescimento micelial (CI<sub>50</sub>) para isolados do fungo. Pela determinação da CI<sub>50</sub> dos fungicidas é possível se monitorar a fungitoxicidade dos produtos ao longo das safras de cultivo. Assim, o objetivo da pesquisa foi determinar *in vitro* a fungitoxicidade de fungicidas de distintos mecanismos de ação puros ou em mistura a isolados de *C. truncatum*, provenientes de diferentes regiões produtoras de soja.

### 3.3 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia/Micologia, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo/UPF, no ano de 2016. Foi determinada *in vitro* a fungitoxicidade de 26 fungicidas (Tabela 1) de diferentes mecanismos de ação isolados, ou em misturas, para dois isolados de *C. truncatum* (Tabela 2), sendo um proveniente do estado de Mato Grosso, e o outro, do estado do Rio Grande do Sul. Os dois isolados foram obtidos de hastes e vagens da soja com sintomas da antracnose. Para tal, foi realizado o isolamento do fungo a partir dos tecidos doentes, sendo desinfestados superficialmente com solução aquosa de hipoclorito de sódio (2%). Porções de tecido foliar (codificados como MFs) e de hastes e vagens (codificados por CTs), foram mantidos em gerbox contendo espuma de nylon e duas folhas de papel germi-teste, saturadas com água destilada e incubadas em câmara de crescimento por três dias. Os acérvulos do fungo foram transferidos para placas de petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), mantidos por sete dias em câmara de crescimento, temperatura  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Em seguida procedeu-se o isolamento monospórico segundo Alfenas e Mafia (2007).

Foi realizada a prova de patogenicidade para os dois isolados utilizando a cultivar BMX Potência RR (considerada suscetível). As sementes foram submetidas à análise sanitária de sementes através do plaqueamento em meio ágar sólido (BDA ou MEA) (BRASIL, 2009, p. 34). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto pelos dois isolados do fungo, com cinco repetições e sendo a unidade experimental o vaso plástico com as plantas. Foi realizada a inoculação artificial de *C. truncatum* em plantas de soja cultivadas em vasos plásticos contendo 500 g de solo. Para a semeadura foram feitas cinco covas e semeadas três sementes/cova e após a emergência mantida somente uma plântula por cova. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

Para a suspensão de conídios utilizou-se a concentração de  $6 \times 10^5$  esporos/mL. A suspensão foi inoculada nas plantas de soja por aspersão, no estágio fenológico V4 (quarto nó, terceira folha trifoliolada aberta) (FEHR; CAVINESS, 1977) e adicionado

duas gotas do surfactante Tween 20 em 100 mL de água. A inoculação foi realizada pela aspersão da suspensão de conídios nas plantas de soja, em cinco vasos (20 mL/vaso) para cada isolado. No tratamento controle (testemunha) foi aspergido somente água e surfactante. Após a inoculação, as plantas foram colocadas em câmaras revestidas com plástico transparente, uma para cada isolado, e molhadas com aspersão por um minuto, em intervalos de quatro horas, para fornecer ambiente favorável à infecção, durante 24 horas.

Foi realizado o isolamento do fungo, de órgãos que apresentaram sintomas. Foi feita a desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (2%) por três minutos, e porções do tecido transferido para placas de petri com meio de cultura BDA e mantidas em câmara de crescimento com luz contínua e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Após o aparecimento das colônias do fungo, e esporulação, novamente procedeu-se a inoculação por aspersão de conídios em plantas de soja saudáveis. Decorridos 10 dias, analisou-se a presença de sintomas da antracnose.

Para a determinação da  $CI_{50}$  utilizou-se o meio PDA (potato, dextrose, Ágar, 39 g/L de água destilada) (MerckKFaA, Darmstadt, Germany), agitado por um minuto e autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Nos testes com IQe não foi adicionado o ácido salicílico droxâmico (SHAM) ao meio de cultura, baseado no relato de Vincelli e Dixon (2002). Foram utilizadas cinco concentrações finais de cada fungicida: 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 40 mg/L mais 0 mg/L (testemunha). Na obtenção das concentrações, foram preparadas duas suspensões estoques de 100 mL de água destilada e esterilizada, e adicionado os volumes necessários de cada fungicida (de acordo com a concentração dos ingredientes ativos). A partir da primeira suspensão foi transferida 1,0 mL para a segunda diluição, em Erlenmeyer com 99,0 mL de água destilada-esterilizada. Da primeira suspensão, obteve-se as concentrações de 1,0, 10, 40 e 100 mg/L e da segunda as concentrações 0,01 e 0,1 mg/L. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar de ar, sendo que os fungicidas foram adicionados ao meio de cultura quando a 45 °C, e vertido em placas de petri plásticas novas.

Tabela 1 - Fungicidas utilizados no teste de fungitoxicidade para dois isolados de soja de *Colletotrichum truncatum*. Passo Fundo – 2016

Ingrediente ativo	Nome comercial	Concentração (1)	Mecanismo de ação
Azoxistrobina	Priori	250	IQe
Piraclostrobina	Comet	250	IQe
Picoxistrobina	Oranis	250	IQe
Trifloxistrobina	Flint 500 WG	500	IQe
Protioconazol	-	250	IDM
Ciproconazol	Alto 100	100	IDM
Tebuconazol	Folicur 200 EC	200	IDM
Carbendazim	Carbendazim	500	IST
Benzovindiflupir	Solatenol	100	ISDH
Fluxapiroxada	-	300	ISDH
Oxicloreto de cobre	Difere	588	Multissítio
Mancozebe	Unizeb Gold	750	Multissítio
Clorotalonil	Previnil SC	730,6	Multissítio
Piraclostrobina + fluxapiroxada	Orkestra SC	167 +333	IQe + ISDH
Piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada	Ativum EC	50 + 81 +50	IQe+ IDM + ISDH
Protioconazol + trifloxistrobina	Fox	150 +175	IDM + IQe
Trifloxistrobina + protioconazol + bixafeno	Fox Xpro	15 + 17,5 + 12,5	IQe + IDM + ISDH
Azoxistrobina + benzovindiflupir	Elatus	300 + 150	IQe + ISDH
Tebuconazol + picoxistrobina	Horos	200 +120	IDM + IQe
Tebuconazol + mancozebe + picoxistrobina	Cronnos	40 + 40 + 600	IDM + Multissítio + IQe
Ciproconazol + picoxistrobina	Approach Prima	200 + 80	IDM + IQe
Ciproconazol + trifloxistrobina	Sphere Max	375 + 160	IDM + IQe
Epoxiconazol + piraclostrobina	Abacus SC	160 + 260	IDM + IQe
Epoxiconazol + cresoxim-metílico	Guapo	125 + 125	IDM + IQe
Ciproconazol + azoxistrobina	Priori Xtra	80 + 200	IDM + IQe

Fonte: dados do autor.

Nota: SC (Suspensão concentrada), EC (Concentrado emulsionável) e WG (Grânulo dispersível).

(1) Em g/L ou kg.

Tabela 2 - Descrição dos isolados de soja de *Colletotricum truncatum*. Passo Fundo – 2016

Código	Município	Estado	Data de coleta	Cultivar
CT6	Claúdia	MT	29/01/2016	BMG Desafio RR
CT21	Almirante Tamandaré do Sul	RS	31/01/2016	DM54I52 IPRO

Fonte: dados do autor.

No dia seguinte ao preparo dos meios, um disco da cultura pura (isolados monospóricos) do fungo, com 5,5 mm de diâmetro foi colocado no centro da placa de petri contendo o meio suplementado com o fungicida nas diferentes concentrações. As placas foram vedadas com papel filme de PVC e incubadas em câmara de crescimento, com luz contínua e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. A avaliação foi realizada com um paquímetro digital, medindo o diâmetro das colônias, assim que o crescimento da colônia do fungo da testemunha atingiu a borda da placa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, bifatorial (isolados e fungicidas) com quatro repetições e a unidade experimental uma placa de Petri.

Os dados foram submetidos à análise estatística de regressão linear utilizando o programa RStudio, e determinada a  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50%) dos isolados. A classificação dos isolados quanto à sensibilidade aos fungicidas foi baseada nos critérios propostos por Edgington e Klew (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. Foram obtidos os valores de p (probabilidade) e do erro (Resíduo).

### 3.4 Resultados

Com relação aos IQe, verificou-se variação da  $CI_{50}$  entre os fungicidas deste grupo (Tabela 3). A azoxistrobina apresentou a menor  $CI_{50}$ , com 5,50 mg/L para o isolado CT6 e de 19,45 mg/L para CT21. Piraclostrobina, picoxistrobina e trifloxistrobina apresentaram  $CI_{50}$  elevadas de 27,59 a  $>40$  mg/L entre os dois isolados. Para picoxistrobina o isolado CT6 apresentou 27,59 mg/L, enquanto para CT21 foi  $>40$  mg/L. Para os outros dois ingredientes ativos os valores foram entre 31,16 e  $>40$  mg/L,

indicando baixa sensibilidade (EDGINGTON; KLEW, 1971). Em relação à  $CI_{50}$  média entre os dois isolados, a menor foi da azoxistrobina (12,47 mg/L), seguida da picoxistrobina e da piraclostrobina (33,79 e 35,58 mg/L), e a maior foi da trifloxistrobina (>40 mg/L).

No grupo dos IDM, para o protioconazol foi determinada a menor  $CI_{50}$  para o isolado CT6, com 6,72 mg/L, porém para o CT21 foi de 31,46 mg/L, indicando redução da sensibilidade do isolado CT21. Na sequência, o tebuconazol com 11,41 mg/L (CT6) e 8,84 mg/L (CT21), apresentando pouca diferença entre os isolados. A maior  $CI_{50}$  foi do ciproconazol (>40 mg/L), para ambos os isolados. Em relação a  $CI_{50}$  entre os isolados, o fungicida que apresentou a menor média foi o tebuconazol (10,12 mg/L), o protioconazol em segundo (19,09 mg/L), ambos classificados como moderadamente tóxicos e a maior o ciproconazol (>40 mg/L), considerado não tóxico pela classificação de Edgington e Klew (1971).

O grupo ISDH apresentou menor  $CI_{50}$  para o benzovindiflupir para os dois isolados, com 0,0042 mg/L para CT6 e 0,023 mg/L para CT21, enquanto que para a fluxapiroxada foi superiores a 40 mg/L. Apesar de ambos fungicidas pertencerem ao mesmo mecanismo de ação, a classificação foi diferente de acordo com a  $CI_{50}$ , pois os isolados apresentaram alta sensibilidade ao benzovindiflupir e baixa sensibilidade a fluxapiroxada.

Para o IST, grupo químico benzimidazol, o ingrediente ativo carbendazim apresentou  $CI_{50}$  de 38,61 mg/L, para o CT6 e 0,0013 mg/L para CT21, demonstrando comportamento distintos entre isolados para o mesmo ingrediente ativo, pois a classificação do CT6 foi moderadamente sensível e CT21 foi considerado altamente sensível.

Para os multissítios, as menores  $CI_{50}$  foram obtidas para o clorotalonil, com 2,58 mg/L (CT6) e 1,11 mg/L (CT21). As  $CI_{50}$  médias entre os isolados, CT6 e CT21, foram em ordem crescente clorotalonil, com 1,84 mg/L, oxiclreto de cobre, 22,75 mg/L e mancozebe com 27,33 mg/L, todos na faixa de concentração de moderadamente tóxicos.

Em relação as misturas comerciais com IQe, apresentaram as menores  $CI_{50}$  médias o ciproconazol + trifloxistrobina (0,85 mg/L), protioconazol + trifloxistrobina (11,80 mg/L) e epoxiconazol + piraclostrobina (13,65 mg/L). As misturas tebuconazol + picoxistrobina, tebuconazol + mancozebe + picoxistrobina, ciproconazol + picoxistrobina e epoxiconazol + cresoxim-metílico apresentaram  $CI_{50}$  acima de 40 mg/L (insensíveis), para CT6, enquanto que, para CT21, apenas o tebuconazol + picoxistrobina apresentou a mesma  $CI_{50}$ .

Para as misturas comerciais com ISDH obteve-se a menor  $CI_{50}$  para a azoxistrobina + benzovindiflupir, com 0,00033 mg/L para CT6 e 0,0013 mg/L para CT21. As  $CI_{50}$  médias entre isolados foram >40 mg/L para a trifloxistrobina + protioconazol + bixafeno (não tóxicos) e 27,60 mg/L para a piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada (moderadamente tóxicos).

Para o isolado CT6, as médias de  $CI_{50}$  entre os grupos químicos de fungicidas variaram de 19,08 a 38,61 mg/L (Tabela 3). A maior  $CI_{50}$  média foi para o IST (38,61 mg/L) e a menor para o multissítio (19,08 mg/L). Para os demais grupos químicos, a média da  $CI_{50}$  foi de 19,37 para IDM, de 20,00 mg/L para ISDH, de 28,96 mg/L para mistura comercial com IQe, de 20,42 mg/L para mistura comercial com ISDH e de 28,27 mg/L para IQe. Com relação ao isolado CT21, houve variação de 0,0013 a 32,65 mg/L para as médias de  $CI_{50}$  entre os mecanismos de ação. A maior  $CI_{50}$  foi para a IQe com 32,65 mg/L e a menor para IST com 0,0013 mg/L. Para os demais grupos químicos, o valor médio de  $CI_{50}$  foi de 12,11 mg/L para mistura comercial com IQe, de 15,54 mg/L para multissítio, de 15,10 mg/L para mistura comercial com ISDH, de 20,00 mg/L para ISDH e de 26,77 mg/L para IDM, para todos os mecanismos de ação a classificação de Edgington e Klew (1971) indica como moderadamente tóxicos.

A associação de azoxistrobina + benzovindiflupir (0,0008 mg/L) apresentou a menor  $CI_{50}$  média para os dois isolados, isso se deve principalmente ao fato do benzovindiflupir ter apresentado  $CI_{50}$  baixa (altamente sensível) aos dois isolados, aliado à azoxistrobina, que dentre os IQes, foi o ingrediente ativo com menor  $CI_{50}$  (Apêndice I). A maior  $CI_{50}$  foi para a trifloxistrobina + protioconazol + bixafeno (>40



mg/L). A menor  $CI_{50}$  média geral de foi observado para o isolado CT21 com 17,45 mg/L, enquanto que para CT6 foi de 24,99 mg/L. Os valores de p (probabilidade de significância) e erro (Tabela 3) foram calculados para os dois isolados, sendo determinados para todos os valores de  $CI_{50}$  em relação aos fungicidas.

Tabela 3 - Concentração inibitória (50%) ( $CI_{50}$ ) de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* para diferentes fungicidas. Passo Fundo – 2016

(Continua)

Fungicidas	CT6			CT21			Média
	$CI_{50}$ (1)	p	erro	$CI_{50}$	p	erro	
IQe							
Azoxistrobina	5,50	0,9850	291,06	19,45	NA	NA	12,47
Piraclostrobina	>40	0,1064	49,12	31,16	0,9187	302,95	35,58
Picoxistrobina	27,59	0,9725	794,23	>40	NA	NA	33,79
Trifloxistrobina	>40	0,0000	1,10 <sup>+47</sup>	>40	0,0000	6,29 <sup>+38</sup>	>40
Média	28,27	-	-	32,65	-	-	-
IDM							
Ciproconazol	>40	0,5466	707,86	>40	0,1092	97,05	>40
Tebuconazol	11,41	0,0000	1,34	8,84	0,0000	0,86	10,12
Protioconazol	6,72	0,0030	2,10	31,46	0,0058	10,69	19,09
Média	19,37	-	-	26,77	-	-	-
ISDH							
Benzovindiflupir	0,0042	0,2676	0,0038	0,023	0,6215	0,046	0,0136
Fluxaproxada	>40	0,9885	11806,5	>40	0,8795	834,39	>40
Média	20,00	-	-	20,00	-	-	-
IST							
Carbendazim	38,61	0,1746	23,38	0,0013	0,0482	0,0009	19,30
Média	38,61	-	-	0,0013	-	-	-
MULT							
Clorotalonil	2,58	0,9063	21,74	1,11	0,9625	23,38	1,84
Oxicloreto de cobre	>40	0,9467	750,38	5,51	0,9515	89,87	22,75
Mancozebe	14,66	0,0000	2,03	>40	0,2408	105,77	27,33
Média	19,08	-	-	15,54	-	-	-

Tabela 3 - Concentração inibitória (50%) (CI<sub>50</sub>) de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* para diferentes fungicidas. Passo Fundo – 2016

(Conclusão)

MEST							
Protio + trifloxi	18,37	NA	NA	5,23	0,9688	132,42	11,80
Tebuco + picoxi	>40	0,0000	10,50	>40	0,7865	499,62	>40
Tebuco + manc + picoxi	>40	0,0000	10	14,79	0,1308	9,56	27,39
Cipro + azoxi	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cipro + picoxi	>40	NA	NA	1,64	NA	NA	20,82
Cipro + trifloxi	0,15	0,9844	7,82	1,56	0,9842	78,65	0,85
Epoxi + piraclo	24,22	0,0006	6,39	3,09	0,0895	1,77	13,65
Epoxi + Cresoxim-metílico	>40	0,6957	170,83	18,44	0,0000	3,47	29,22
Média	28,96	-	-	12,11	-	-	-
MCAR							
Piraclo + epoxi + fluxa	>40	0,0884	58,70	15,21	0,1331	9,89	27,60
Piraclo + fluxa	1,68	0,9396	21,95	5,21	NA	NA	3,45
Azoxi + benzovin	0,00033	0,2849	0,00039	0,0013	NA	NA	0,0008
Trifloxi + protio + bixa	>40	0,0846	82,61	>40	0,0012	23,87	>40
Média	20,42	-	-	15,10	-	-	-
Média Geral	24,99	-	-	17,45	-	-	-

Fonte: dados do autor.

Nota: IQe (Estrobilurina), IDM (Triazol), ISDH (Carboxamida), IST (Benzimidazol), MULT (Multissítios), MEST (Mistura comercial com estrobilurina), MCAR (Mistura comercial com carboxamida), Fluxa (fluxapiraxada), Piraclo (piraclostrobina), Epoxi (epoxiconazol), Trifloxi (trifloxistrobina), Protio (protioconazol), Azoxi (azoxistrobina), Tebuco (tebuconazol), Picoxi (picoxistrobina), Manc (mancozebe), Cipro (ciproconazol), Benzovin (benzovindiflupir), Bixa (bixafeno). NA (não ajustado, significa que a curva não foi totalmente ajustada para determinar a dose). >40 (dose estimada acima da dose mais alta). A faixa aceitável para p é até 0,05.

(1) Em mg/L.

### 3.5 Discussão

O processo de adaptação do fungo ao fungicida resulta na seleção de indivíduos menos sensíveis. O monitoramento da sensibilidade aos fungicidas é uma atividade essencial para o desenvolvimento de programas de controle efetivos, pois os resultados demonstram o surgimento de mutantes resistentes a fungicidas em populações de *C. truncatum* (CALZADA et al., 2015; SILVA-JÚNIOR, et al., 2014).

O IST foi o que demonstrou maior variação no valor de  $CI_{50}$ , embora tenha sido utilizado apenas um representante do grupo. Resultados obtidos em outro estudo realizado com isolados de *Colletotrichum* spp., provenientes de São Paulo (Brasil) e Flórida (Estados Unidos), também observaram que a exposição do fungo ao benomil (grupo químico benzimidazol), inibiu total e parcialmente isolados dependendo da espécie de *Colletotrichum*, porém, dentre as populações foram encontrados isolados altamente resistentes (PERES et al., 2004).

Os isolados testados, com origem de duas regiões do Brasil apresentam sensibilidade distinta aos fungicidas. Esse comportamento também foi encontrado em isolados de *C. truncatum* provenientes de diferentes regiões de Trindade e Tobago, indicando que o uso repetido de fungicidas com os ingredientes ativos do grupo benzimidazol, pode explicar a sensibilidade reduzida nas populações do patógeno (RAMDIAL; HOSEIN; RAMPERSAD, 2016). Outro fator que contribui para esse cenário são as práticas de cultivo, que alteram a sensibilidade dos isolados aos fungicidas, visto que não existe um único fungicida que seja eficaz contra todas as doenças da cultura, portanto, é necessário combinar diferentes substâncias químicas para otimizar o controle (RAMDIAL; ABREU; RAMPERSAD, 2017).

O benzovindiflupir, uma carboxamida (ISDH), apresentou a maior capacidade inibitória do fungo. Por outro lado, os isolados apresentaram baixa sensibilidade à fluxapiraxada (ISHII et al., 2016). Esse fungicida tem sido usado no controle de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e de *Rhizoctonia solani* Kuhn (UPALA; ZHOU, 2018).

Um estudo conduzido no norte do Brasil verificou que a utilização de clorotalonil (um multissítio) utilizado isoladamente apresentou maior incidência da doença em plantas do que tratamentos com as misturas comerciais de trifloxistrobina + tebuconazol + carbendazim, trifloxistrobina + protioconazol, trifloxistrobina + ciproconazol, picoxistrobina + tebuconazol + carbendazim, piraclostrobrina + epoxiconazol, azoxistrobina + ciproconazol, trifloxistrobina + tebuconazol e picoxistrobina + ciproconazol (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016), diferindo dos dados obtidos no presente trabalho.

Há diferença na sensibilidade de isolados do fungo em relação ao mesmo ingrediente ativo, uma vez que foram observadas populações do fungo com redução da sensibilidade para o grupo IDM, principalmente em relação ao ingrediente ativo tebuconazol (WONG; MIDLAND, 2007). Porém, foi verificado em outro estudo com isolados de *C. truncatum* aos fungicidas, submetidos ao teste de inibição do crescimento micelial, a sensibilidade ao epoxiconazol e ao difenoconazol, mas não para tebuconazol, confirmando o risco de desenvolvimento da resistência, avaliado para o grupo químico triazol, com 112 isolados de *C. truncatum* obtidos de pimenta provenientes de 13 regiões da China (ZHANG et al., 2017).

A  $CI_{50}$  para isolados de *C. acutatum* Simmonds, patogênico ao morangueiro, para a azoxistrobina, variou para dois locais, Maravatio (de 0,04 a 0,36  $\mu\text{g mL/L}$ ) e Zamora (0,07 a 0,99  $\mu\text{g/mL}$ ), maior para Zamora, porém apresentando sensibilidade nos dois locais (ALTAMIRANO et al., 2017). Para isolados de *C. gloeosporioides* oriundos do Japão, foi demonstrada a sensibilidade à azoxistrobina (YOKOSAWA et al., 2017).

O desenvolvimento da resistência múltipla foi comprovada à azoxistrobina e ao tiabendazol em populações de *C. truncatum* (CALZADA et al., 2015). A resistência de *Colletotrichum* spp. também foi verificada para a azoxistrobina e ao tiofanato-metílico, e ao analisar a população de diferentes regiões, isolados com mesma origem apresentavam comportamentos iguais, sugerindo que a resistência de campo deriva de um antepassado comum, através de seleção de indivíduos resistentes (HU et al., 2015).

O uso de fungicida no manejo de doenças da soja no Brasil apresentou aumentos nas últimas safras. Dados apontam que ocorreu variação no número de aplicações de fungicidas da safra 15/16 para 16/17, aumentando em média nas regiões Centro/Cerrado (17,1%) e Sul (6,8%). A utilização de misturas comerciais aumentou no país em 3,5%, e nas regiões do Centro/Cerrado em 6,6% e Sul/Sudeste em 7,8%. Ocorreu aumento na utilização dos fungicidas, de 17% em 15/16 para 23% em 16/17 nas aplicações em estádio vegetativo e de 25% para 27% no reprodutivo. Destacando o Mato Grosso que apresentou aumento médio de 6% na utilização de fungicidas ISDH (fluxapiraxada) e aumento no número médio de aplicação de 1,48 na safra 14/15 para 1,83 na safra 16/17 (SPARK, 2017).

A utilização de fungicidas protetores (multissítio) no Brasil cresceu de 6% na safra 14/15 para 14% em 16/17. A antracnose no Brasil teve incidência maior na safra 16/17 (17,5%) que na anterior 15/16 (12,4%), variando nas regiões Sul (5% em 15/16 para 3% em 16/17) e Centro (12,8% em 15/16 para 21,6% em 16/17) (SPARK, 2017), indicando que a doença necessita de um manejo mais eficiente para seu controle.

### **3.6 Conclusões**

A mistura comercial azoxistrobina + benzovindiflupir apresenta maior fungitoxicidade, com menor  $CI_{50}$  para os dois isolados (0,0008) do fungo de *C. truncatum*. O isolado CT6 apresenta maior  $CI_{50}$  para o IST (38,61), enquanto a menor foi para o multissítio (19,08). Já para o isolado CT21 o maior valor é observado para o para os IQe (32,65) e o menor para IST (0,0013). Ocorre variabilidade da  $CI_{50}$  para os dois isolados, indicando que a redução da sensibilidade é alterada em função das diferenças no controle químico entre regiões.

## 4 CAPÍTULO II

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum truncatum* da soja a fungicidas com distintos mecanismos de ação.

### 4.1 Resumo

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* afeta negativamente a produção da soja, sendo considerado fator limitante de produção. O controle químico é a estratégia mais utilizada, porém a eficiência dos fungicidas é alterada conforme a redução da sensibilidade do fungo, medida pela  $CI_{50}$ . A variação na sensibilidade do fungo ocorre de acordo com a origem do isolado e ingredientes ativos e mecanismos de ação usados. O objetivo da pesquisa foi avaliar a sensibilidade de isolados de *C. truncatum* provenientes de diferentes regiões produtoras de soja no Brasil, aos fungicidas de distintos mecanismos de ação isolados ou em mistura. Para o experimento de determinação da sensibilidade de isolados do fungo *in vitro*, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, delineamento de tratamentos do tipo bifatorial, com 28 isolados e seis fungicidas. As unidades experimentais foram placas de Petri (79,4 mm de diâmetro) com quatro repetições. A mistura de ingredientes ativos azoxistrobina + benzovindiflupir (0,051 mg/L) foi a que apresentou menor  $CI_{50}$ , enquanto o mancozebe apresentou a maior (90,41 mg/L). A piraclostrobina (75,59 mg/L) e o ciproconazol (77,09 mg/L) apresentaram  $CI_{50}$  mais elevadas do que as misturas. BA (17,09 mg/L) e MT (39,22 mg/L) apresentaram as menores  $CI_{50}$  e RS (68,97 mg/L) e isolados sem identificação (54,31 mg/L) apresentaram as mais altas. TO e PR apresentaram  $CI_{50}$  iguais (44,0 mg/L). A sensibilidade do fungo variou de acordo com a origem e mecanismos de ação do fungicida. Dessa forma, o controle do fungo poderá alterar-se de acordo com o ambiente e com o fungicida utilizado. Além disso, a variabilidade na população do fungo ocorreu de forma progressiva e temporal.

Palavras-chave: 1. Antracnose. 2. *Glycine max*. 3. Ingredientes ativos. 4. Mecanismos de ação.

### 4.2 Introdução

A antracnose da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] causada pelo fungo imperfeito *Colletotrichum truncatum* Andrus & Moore é relatada nas principais regiões produtoras da cultura no mundo, com distribuição ampla em praticamente todos os continentes, e incluindo países como Estados Unidos, China e Índia (ISHII et al., 2016; FERNANDES et al., 2015). No Brasil, é encontrada em todas as áreas produtoras de soja,

principalmente no Centro-Oeste, região em que surtos da doença são crescentes a cada safra (PESQUEIRA; BACCHI; GAVASSONI, 2016).

Como a maior parte da área é cultivada em monocultura e plantio direto, as doenças causadas por necrotróficos, como a antracnose, ocorrem em praticamente na totalidade das áreas em com maior intensidade. Essas condições oferecem condições ótimas à sobrevivência do fungo nos restos culturais que permanecem na superfície do solo. Além disso, o fungo sobrevive e é transmitido via semente. Outro aspecto peculiar da doença é causar infecção latente, que ocorre quando a plântula é infectada na fase vegetativa, e os sintomas aparecendo somente em estádios finais, de enchimento de grãos. O fungo pode causar sintomas que vão desde tombamento de plântulas e necrose de cotilédones, até redução da área fotossintética, causando necrose em hastes, pecíolos e vagens, além de abertura das vagens (ALMEIDA et al., 2005, p. 650; COSTA et al., 2009; ROGÉRIO et al., 2016).

O controle da doença pode ser feito com ações preventivas, como produção de sementes em lavouras com rotação de culturas, tratamento de sementes com fungicidas e doses eficientes, resistência genética, além da aplicação de fungicida na parte aérea (HENNING et al., 2009; REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 146). Para as duas primeiras estratégias, o controle não demonstra o sucesso desejado, visto que o patógeno sobrevive em restos culturais, podendo infectar as plantas em qualquer estágio fenológico (KATOCH; PRABHAKAR; SHARMA, 2016; ROGÉRIO et al., 2016).

Desse modo, como não tem sido praticada a rotação de cultura o controle químico através da aplicação de fungicidas na parte aérea é a estratégia de controle mais usada. Porém, há relatos de que a eficiência dos fungicidas vem diminuindo a cada safra, apresentando menor controle da doença, demonstrando que o fungo pode estar apresentando redução da sensibilidade aos diferentes grupos de fungicidas (BESTOR; ROBERTSON; MUELLER, 2011; DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

Os fungicidas aplicados na cultura da soja visam principalmente ao controle da ferrugem e das doenças de final de ciclo (DFCs). Têm sido utilizados fungicidas com

quatro mecanismos de ação: triazol ou inibidor da síntese de membranas ou (IDM), a estrobilurina ou inibidor da respiração no complexo II (IQe), a carboxamida, inibidora da succinato desidrogenase no complexo III (ISDH) e o benzimidazol ou inibidores da síntese da tubulina (IST) (FRAC, 2017; REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 58-70).

Formulou-se a hipótese de que devido ao uso generalizado de fungicidas sítio-específicos em uma grade área com diversas aplicações/área a falha de controle reclamada pelos produtores pode ser devida a redução da sensibilidade do fungo aos fungicidas.

Então, se torna necessário determinar a concentração *in vitro* que iniba 50% o crescimento micelial (CI<sub>50</sub>) para isolados do fungo e fungicidas utilizados na cultura. Através da determinação da CI<sub>50</sub> dos fungicidas é possível se monitorar a fungitoxicidade dos produtos ao longo das safras de cultivo. O objetivo do trabalho foi avaliar a sensibilidade de isolados de *C. truncatum* provenientes de diferentes regiões produtoras de soja, aos fungicidas de distintos mecanismos de ação isolados ou em mistura.

#### **4.3 Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia/Micologia da Universidade de Passo Fundo/UPF, em 2016/2017. Os 28 isolados do fungo *C. truncatum* (Tabela 1) foram obtidos de folhas, hastes e vagens de soja com sintomas da antracnose, provenientes de diferentes regiões do Brasil. Cada isolado recebeu um código de identificação para manutenção e armazenamento. Para tal, foi realizado o isolamento do fungo a partir dos tecidos doentes, sendo desinfestados superficialmente com solução aquosa de hipoclorito de sódio (2%). Porções de tecido foliar (codificados como MFs) e de hastes e vagens (codificados por CTs), foram mantidos em gerbox contendo espuma de nylon e duas folhas de papel germi-teste, saturadas com água destilada e incubadas em câmara de crescimento por três dias para esporular. Com uma agulha histológica flambada, acérvulos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) e mantidos por sete dias em câmara de



crescimento, temperatura  $28 \pm 2$  °C. Em seguida procedeu-se o isolamento monospórico segundo Alfenas e Mafia (2007).

Tabela 1 - Identificação de isolados de *Colletotrichum truncatum* provenientes de diferentes regiões produtoras de soja do Brasil. Passo Fundo – 2016

Código	Município	Estado	Data de coleta	Cultivar
CT3	Tapurah	MT	27/01/2016	TMG 132
CT4	Tapurah	MT	27/01/2016	Nidera 7901
CT7	Vera	MT	28/01/2016	-
CT9	Luís Eduardo Magalhães	BA	02/02/2016	8314 IPRO
CT10	Luís Eduardo Magalhães	BA	02/02/2016	8372
CT12	Luís Eduardo Magalhães	BA	02/02/2016	9144 RR
CT13	Formosa	GO	18/01/2016	BMG Desafio RR
CT14	Formosa	GO	18/01/2016	BMG Desafio RR
CT17	Formosa	GO	28/01/2016	AS 7307 RR
CT18	Rio Verde	GO	-	TMG 132
CT22	-	-	29/01/2016	-
CT24	Rosário	BA	14/03/2016	8372
CT26	-	-	14/03/2016	MS8349
CT28	Paulo Freitas	PR	03/03/2016	DOW 5D634
CT31	Passo Fundo	RS	-	PY95R51
CT32	São Gabriel	RS	-	NA5909 RR
CT34	Passo Fundo	RS	03/2016	BMG Desafio RR
CT35	Ponto Nacional	TO	03/2016	BG 4290
CT36	Paraíso	TO	03/2016	CD 251
CT37	Miracema	TO	03/2016	Monsoy 820
CT38	Miranorte	TO	03/2016	Monsoy 8644
CT39	Tangará da Serra	MT	03/2016	-
CT 40	Castro	PR	29/03/2016	NA5909 RG
CT 41	Castro	PR	29/03/2016	PP6400 IPRO
MF1	Tapurah	MT	27/01/2016	TMG 132
MF2	Lucas do Rio Verde	GO	29/01/2016	-
MF3	-	-	-	-
MF4	Tangará da Serra	MT	-	-

Fonte: dados ao autor.

Nota: MT (Mato Grosso), GO (Goiás), RS (Rio Grande do Sul), PR (Paraná), TO (Tocantins) e BA (Bahia).

#### 4.3.1 Patogenicidade de *Colletotrichum truncatum* à soja

Com os isolados monospóricos foi realizada a prova de patogenicidade dos 28 isolados (Tabela 1), utilizando a cultivar BMX Potência RR (considerada como suscetível). As sementes foram submetidas à análise sanitária através do plaqueamento em meio Ágar sólido (BDA ou MEA) (BRASIL, 2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto pelos 28 isolados do fungo, com cinco repetições e sendo a unidade experimental um vaso plástico. A inoculação foi feita em plantas e em sementes de soja.

A inoculação em plantas foi feita na cultivar BMX Potência RR, cultivadas em vasos plásticos contendo 500 g de solo. Para a semeadura foram feitas cinco orifícios e em cada semeador com três sementes e, após a emergência, mantida uma plântula por cova. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com temperatura de  $28 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas.

Para a produção de conídios de *C. truncatum* utilizou-se os isolados CT13, CT17, CT32 e CT36 na concentração de  $6 \times 10^5$  esporos/mL. A suspensão foi inoculada por aspersão, no estágio fenológico V4 (quarto nó, terceira folha trifoliolada aberta) (FEHR & CAVINESS, 1977) e adicionada duas gotas do surfactante Tween 20 em 100 mL de água. No tratamento controle (testemunha) foi aspergido somente água e surfactante. Após a inoculação, as plantas foram colocadas em bandeijas plásticas transparentes, uma para cada isolado, e molhadas por aspersão por um minuto, em intervalos de quatro horas, para fornecer ambiente favorável à infecção, durante 24 horas.

Foi realizado o isolamento do fungo, de órgãos da planta com sintomas submetidos à desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (2%) por três minutos, dispostos em placas de Petri com meio de cultura BDA e mantidas em câmara com luz contínua e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Após o desenvolvimento das colônias do fungo e esporulação, novamente procedeu-se a inoculação por aspersão de conídios em plantas de soja saudáveis. Decorridos 10 dias, avaliou-se a presença de sintomas da antracnose.

A inoculação das sementes de soja foi realizada utilizando o restritor hídrico manitol, adicionado em meio de cultura BDA. Para isso, utilizou-se 24 isolados do fungo (Tabela 1, exceto para os isolados CT13, CT17, CT32 e CT36), repicados em meio de cultura BDA acrescido de manitol no potencial hídrico de -1,0 MPa, correspondente à 73,597 g de manitol/L de água destilada (REY et al., 2008), com autoclavagem do meio por 20 minutos a 121 °C, e vertido em placas de petri. O fungo foi transferido para cinco pontos equidistante na placa que foram vedadas com papel filme PVC e colocadas em câmara com luz contínua, temperatura de  $25 \pm 2$  °C por sete dias. Após esse período, 100 g de sementes de soja foram distribuídas sobre as colônias, em camada única e levemente prensada. As sementes foram incubadas durante 48 horas em contato com o fungo para a infecção. Decorrido esse tempo, as sementes de soja foram retiradas do meio e deixadas sobre papel germi-teste por 48 horas para secagem.

Em seguida, as sementes foram semeadas em vasos plásticos contendo 500 g de solo, seis sementes por recipiente. As plântulas foram avaliadas aos sete dias após a emergência, verificando a presença ou ausência dos sintomas. Após a avaliação foi realizado o reisolamento do fungo, das partes com sintoma. Para o isolamento realizou-se a desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (2%), por três minutos. Os fragmentos de tecido vegetal foram dispostos em placas de petri com meio de cultura BDA e mantidos em câmara de crescimento com luz contínua e temperatura de  $25 \pm 2$  °C, por sete dias, para o crescimento das colônias.

#### **4.3.2 Determinação da sensibilidade de isolados de *Colletotrichum truncatum* a fungicidas *in vitro***

A sensibilidade de 28 isolados do fungo (Tabela 1) foi determinada para seis fungicidas (Tabela 2) selecionados a partir do experimento de fungitoxicidade de 26 fungicidas (Capítulo I). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, delineamento de tratamentos bifatorial (isolados e fungicidas), com quatro repetições e unidade experimental uma placa de Petri.

Tabela 2 - Fungicidas utilizados para determinar a sensibilidade de 28 isolados do fungo *Colletotrichum truncatum* provenientes de diferentes regiões produtoras de soja. Passo Fundo – 2016

Ingrediente ativo	Nome comercial	Concentração (1)	Mecanismo de ação
Protioconazol	-	250	IDM
Piraclostrobina	Comet	250	IQe
Ciproconazol	Alto 100	100	IDM
Mancozebe	Unizeb Gold	750	Multissítio
Piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada	Ativum EC	50 + 81 + 50	IQe + IDM + ISDH
Azoxistrobina+ benzovindiflupir	Elatus	300 + 150	IQe + ISDH

Fonte: dados do autor.

Nota: EC (Concentrado emulsionável), IDM (triazol), IQe (estrobilurina), ISDH (carboxamida).

(1) Em g/L ou kg.

Para a realização do experimento, utilizou-se o meio PDA (potato, dextrose e agar) acrescentando-se 39 g/L de água destilada, agitado durante um minuto e autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Nos testes com IQe não foi adicionado o ácido salicílico droxamico (SHAM) ao meio de cultura, como relatado por Vincelli e Dixon (2002). Foram utilizadas cinco concentrações finais de cada fungicida: 0,1; 1; 10; 40 e 100 mg/L mais “0” mg/L (testemunha). Foram preparadas duas suspensões estoques de 100 mL de água destilada e esterilizada, e adicionando-se os volumes necessários de cada fungicida (de acordo com a concentração dos ingredientes ativos). A partir da primeira suspensão estoque foi transferida 1 mL para a segunda suspensão, em Erlenmeyer com 99,0 mL de água destilada e esterilizada. Da primeira suspensão estoque, obteve-se as concentrações de 1, 10, 40 e 100 mg/L e da segunda suspensão estoque a concentração de 0,1 mg/L. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo, sendo que os fungicidas foram adicionados ao meio de cultura quando esse atingiu em torno de 45 °C, e vertido em placas de petri novas, evitando a presença de resíduos.

No dia seguinte ao preparo dos meios, um disco da cultura pura (isolados monospóricos do fungo), medindo 5,5 mm de diâmetro foi colocado no centro da placa

de Petri contendo o meio com o fungicida nas diferentes concentrações. As placas foram vedadas com papel filme de PVC e incubadas em câmara de crescimento, com luz contínua e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. A avaliação foi feita com um paquímetro digital, medindo o diâmetro das colônias, assim que o crescimento da colônia do fungo da testemunha atingiu a borda da placa.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa RStudio, através de regressão linear e determinada a  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50%) dos fungicidas aos isolados de *C. truncatum*. A classificação dos isolados quanto à sensibilidade para os fungicidas foi baseada no critério proposto por Edgington e Klew (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 variação (%) entre os valores de  $CI_{50}$  entre isolados foi calculada através da fórmula:

$$V(\%) = ((CI_{50maior}/CI_{50menor}) - 1) * 100 \quad (1)$$

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Patogenicidade de *Colletotrichum truncatum* à soja

O fungo foi patogênico à soja independente da inoculação em plantas ou em sementes. Foi verificada a presença de sintomas em plantas (hastes, cotilédones e folhas) inoculadas para todos os isolados (Tabela 3).

Tabela 3 - Patogenicidade de isolados do fungo *Colletotrichum truncatum*, plantas de soja inoculadas por dois métodos de inoculação. Passo Fundo – 2017

(Continua)

Código	Município	Inoculação	Sintomas	
			Ausente	Presente
CT3	Tapurah	B	-	+
CT4	Tapurah	B	-	+
CT7	Vera	B	-	+
CT9	Luís Eduardo Magalhães	B	-	+

Tabela 3 - Patogenicidade de isolados do fungo *Colletotrichum truncatum*, plantas de soja inoculadas por dois métodos de inoculação. Passo Fundo – 2017

(Conclusão)

CT10	Luís Eduardo Magalhães	B	-	+
CT12	Luís Eduardo Magalhães	B	-	+
CT13	Formosa	A	-	+
CT14	Formosa	B	-	+
CT17	Formosa	A	-	+
CT18	Rio Verde	B	-	+
CT22	-	B	-	+
CT24	Rosário	B	-	+
CT26	-	B	-	+
CT28	Paulo Freitas	B	-	+
CT31	Passo Fundo	B	-	+
CT32	São Gabriel	A	-	+
CT34	Passo Fundo	B	-	+
CT35	Ponto Nacional	B	-	+
CT36	Paraíso	A	-	+
CT37	Miracema	B	-	+
CT38	Miranorte	B	-	+
CT39	Tangará da Serra	B	-	+
CT40	Castro	B	-	+
CT41	Castro	B	-	+
MF1	Tapurah	B	-	+
MF2	Lucas do Rio Verde	B	-	+
MF3	-	B	-	+
MF4	Tangará da Serra	B	-	+

Fonte: dados do autor.

Nota: A) método de inoculação artificial em plantas de soja. B) método de inoculação artificial em sementes de soja.

#### 4.4.2 Determinação *in vitro* da sensibilidade de isolados de *Colletotrichum truncatum* a fungicidas

Para os isolados de *C. truncatum* do estado da Bahia, a  $CI_{50}$  média entre os fungicidas variou de 0,12 a 39,76 mg/L (Tabela 4). A maior foi para a piraclostrobina (39,76 mg/L) e a menor para azoxistrobina + benzovindiflupir (0,12 mg/L, classificado como altamente tóxico). Para os demais fungicidas a  $CI_{50}$  média foi de 4,04 mg/L para

protioconazol, de 9,30 mg/L para mancozebe, de 11,81 mg/L para piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiraxada e de 30,69 mg/L para o ciproconazol, todos na faixa de concentração de moderadamente tóxicos, segundo Edgington e Klew (1971). A  $CI_{50}$  média entre os isolados foram de 6,53 a 34,72 mg/L, sendo que a menor foi do isolado CT10 (6,53 mg/L) e a maior de CT12 (34,72 mg/L) e para os demais isolados variaram de 7,45 mg/L para CT24 e 17,17 mg/L para CT9. A mistura de fungicidas azoxistrobina + benzovindiflupir apresentou as menores  $CI_{50}$  para todos os isolados e os maiores valores foram de piraclostrobina, exceto para o isolado CT9, que apresentou  $CI_{50}$  mais elevada para ciproconazol.

Para os isolados do estado de Goiás, a  $CI_{50}$  média entre os fungicidas foi de 0,013 a 89,07 mg/L (Tabela 4). A maior  $CI_{50}$  foi para piraclostrobina (89,07 mg/L, não tóxico (NT)) e a menor para azoxistrobina + benzovindiflupir (0,013 mg/L, altamente tóxico (AT)). Para os demais fungicidas a  $CI_{50}$  média foi de 5,46 para protioconazol, de 22,11 mg/L para mancozebe, de 27,38 mg/L para piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiraxada e 37,02 mg/L para o ciproconazol, classificados como moderadamente tóxicos (MT). Entre os isolados, a menor  $CI_{50}$  média foi do CT14 (26,21 mg/L) e a maior para o CT18 (44,45 mg/L), enquanto que para os outros isolados foram 31,74 mg/L para CT13, 37,33 mg/L para MF2 e 39,34 mg/L para CT17. O fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir apresentou as menores  $CI_{50}$  para todos os isolados, enquanto as maiores foram para os isolados CT13, CT14 e MF2 para piraclostrobina, exceto para o isolado CT18, que apresentou a maior  $CI_{50}$  para ciproconazol e CT17 apresentou  $CI_{50}$  superior para ambos (piraclostrobina e ciproconazol).

Os isolados do Mato Grosso, em relação aos fungicidas, apresentaram menor  $CI_{50}$  média para azoxistrobina + benzovindiflupir (0,011 mg/L, AT) e a maior para ciproconazol (47,31 mg/L, NT). A sequência de  $CI_{50}$  médias, em ordem crescente, para os demais fungicidas foi protioconazol (3,28 mg/L), mancozebe (20,48 mg/L), piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiraxada (22,34 mg/L) e piraclostrobina (41,91 mg/L), todos com classificação de moderadamente tóxico. Entre os isolados, a menor  $CI_{50}$  média foi de CT3 (15,71 mg/L) e a maior de CT4 (28,62 mg/L). Para os outros isolados foram 15,76 mg/L para MF4, 22,92 mg/L para CT7, 24,72 mg/L para MF1 e 27,61

mg/L para CT39. Os isolados CT3, CT4 e MF4 apresentaram as maiores  $CI_{50}$  para a piraclostrobina, enquanto que para os isolados CT39 e MF1 as maiores foram para o ciproconazol. Apenas o isolado CT7 apresentou maior  $CI_{50}$  para o mancozebe. A mistura azoxistrobina + benzovindiflupir apresentou as menores  $CI_{50}$  para todos os isolados.

Entre os isolados do estado do Paraná, as  $CI_{50}$  médias para os fungicidas variaram de 0,0027 a 80,51 mg/L (Tabela 4). A maior  $CI_{50}$  foi para a piraclostrobina (80,51 mg/L) e a menor para a azoxistrobina + benzovindiflupir (0,0027 mg/L). Para os demais fungicidas a  $CI_{50}$  média foi de 9,24 mg/L para protioconazol, 16,64 mg/L para a piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada (ambos classificados como moderadamente tóxico) de 52,07 mg/L para ciproconazol (NT) e 55,78 mg/L para mancozebe (NT). A  $CI_{50}$  média entre os isolados foram de 28,79 a 40,48 mg/L, sendo que a menor foi do isolado CT40, a maior foi de CT41 e para o isolado CT28 o valor foi 37,85 mg/L. O fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir apresentou as menores  $CI_{50}$  para todos os isolados, enquanto as maiores variaram entre mancozebe (CT28), piraclostrobina (CT40) e ciproconazol (CT41).

Para os isolados do Rio Grande do Sul, as  $CI_{50}$  médias entre os fungicidas foram de 0,20 mg/L (azoxistrobina + benzovindiflupir), com classifica na faixa de altamente tóxico a 96,48 mg/L (mancozebe), classificado como não tóxico. A  $CI_{50}$  média entre os demais fungicidas foi de 3,99 para o protioconazol, de 25,14 mg/L para a piraclostrobina, de 26,92 mg/L para a piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada e 77,52 mg/L para o ciproconazol. Entre os isolados, a menor  $CI_{50}$  média foi para o CT32 com 28,29 mg/L, seguido do CT34 com 38,93 mg/L e a maior para o CT31 com 48,18 mg/L. A menor  $CI_{50}$  foi do fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir entre todos os isolados. As maiores  $CI_{50}$  variaram entre mancozebe para o CT32, ciproconazol para o CT34 e para o CT28 mancozebe e ciproconazol (todos com >100 mg/L).

Os isolados de Tocantins apresentaram  $CI_{50}$  média para os fungicidas entre 0,0045 (AT) a 75,04 mg/L (NT) (Tabela 4). A maior  $CI_{50}$  foi para o ciproconazol (75,04 mg/L) e a menor para a azoxistrobina + benzovindiflupir (0,0045 mg/L). Os demais



fungicidas apresentaram  $CI_{50}$  média de 16,55 mg/L para o protioconazol, de 18,03 mg/L para a piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada, de 37,88 mg/L para o mancozebe e 59,00 mg/L para a piraclostrobina. Com relação aos isolados, a menor  $CI_{50}$  média foi obtido para o CT36, com 21,56 mg/L e a maior para o CT37, com 42,67 mg/L. Entre os demais isolados as  $CI_{50}$  foram de 31,99 mg/L para o CT35 e de 41,44 mg/L para o CT38. Os isolados CT35 e CT37 apresentaram as maiores  $CI_{50}$  apenas para o fungicida ciproconazol, enquanto CT36 obteve a maior  $CI_{50}$  para a piraclostrobina. Já o isolado CT38 apresentou  $CI_{50}$  mais elevada para dois fungicidas, o mancozebe e o ciproconazol (>100 mg/L). As menores  $CI_{50}$  foram do fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir entre os quatro isolados.

Entre os isolados sem identificação, as  $CI_{50}$  médias para os fungicidas variaram de 0,0065 mg/L (azoxistrobina + benzovindiflupir) a 99,94 mg/L (piraclostrobina). Para os demais fungicidas, as médias variaram de 4,46 mg/L para o protioconazol, 25,12 mg/L para a piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada, 47,95 mg/L para mancozebe e 97,20 mg/L para o ciproconazol. A  $CI_{50}$  média entre os isolados foram de 39,78 mg/L para CT26, 42,71 mg/L para CT22 (CT26 e CT22 como moderadamente sensível) e 54,84 mg/L para MF3 (baixa sensibilidade). O fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir apresentou as  $CI_{50}$  para todos os isolados. Apenas o isolado CT22 obteve a maior  $CI_{50}$  somente para um fungicida (piraclostrobina), enquanto CT26 obteve valor superior para dois fungicidas, ciproconazol e piraclostrobina (>100 mg/L) e MF3 para mancozebe, piraclostrobina e ciproconazol (>100 mg/L), todos a faixa de concentração indicando baixa sensibilidade.

Em relação à média geral da  $CI_{50}$  dos fungicidas para todas as regiões, a menor foi de azoxistrobina + benzovindiflupir (0,051 mg/L) enquanto que a maior foi observada para piraclostrobina (62,19 mg/L) (Tabela 4). Os demais fungicidas apresentaram  $CI_{50}$  médias de 6,72 mg/L para o protioconazol, 21,18 mg/L para a piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada, de 41,42 mg/L para mancozebe e 59,55 mg/L para o ciproconazol. As médias gerais por regiões obtiveram a menor para BA com 15,95 mg/L, seguido de MT (22,56 mg/L), GO (30,17 mg/L), TO (34,41 mg/L), PR (35,71 mg/L), RS (38,47 mg/L) e isolados sem identificação (45,78 mg/L).

Tabela 4 - Concentração inibitória de 50% do crescimento micelial (1) de 28 isolados de *Colletotrichum truncatum* a seis fungicidas. Passo Fundo – 2017

Estado	Isol	Manc	Protio	Azox+ Benz	Piraclo	Piraclo + epoxi + fluxa	Cipro	Média	Média Geral
BA	CT9	5,15	3,79	0,39	26,35	4,61	62,71	17,17	15,95
	CT10	7,62	4,72	0,0020	12,42	0,073	2,03	6,53	
	CT12	13,29	3,97	0,085	>100	33,07	57,93	34,72	
	CT24	11,16	3,68	0,0029	20,26	9,49	0,11	7,45	
	Média	9,30	4,04	0,12	39,76	11,81	30,69	-	-
GO	CT13	23,98	8,88	0,0028	>100	57,53	0,068	31,74	30,17
	CT14	2,67	5,28	0,010	69,60	23,83	55,90	26,21	
	CT17	3,93	5,77	0,0010	>100	26,38	>100	39,34	
	CT18	76,36	4,58	0,0049	75,76	9,97	>100	44,45	
	MF2	3,63	2,80	0,049	>100	19,21	96,93	37,33	
	Média	22,11	5,46	0,013	89,07	27,38	37,02	-	-
MT	CT3	9,02	5,04	0,0028	47,62	8,73	23,88	15,71	22,56
	CT4	3,48	1,66	0,0029	89,47	10,32	66,79	28,62	
	CT7	>100	3,28	0,0018	0,15	34,07	0,04	22,92	
	CT39	2,60	0,19	0,0039	0,021	62,83	>100	27,61	
	MF1	6,45	2,32	0,0054	42,54	10,93	86,07	24,72	
	MF4	1,35	7,23	0,051	71,65	7,16	7,10	15,76	
	Média	20,48	3,28	0,011	41,91	22,34	47,31	-	-
PR	CT28	>100	5,44	0,0031	70,09	2,54	49,04	37,85	35,71
	CT40	4,99	13,11	0,0014	>100	32,00	22,69	28,79	
	CT41	62,37	9,18	0,0036	71,45	15,39	84,48	40,48	
	Média	55,78	9,24	0,0027	80,51	16,64	52,07	-	-
RS	CT31	>100	0,059	0,0088	17,86	71,14	>100	48,18	38,47
	CT32	>100	7,58	0,0014	22,64	6,39	33,16	28,29	
	CT34	90,53	4,33	0,59	34,91	3,22	>100	38,93	
	Média	96,84	3,99	0,20	25,14	26,92	77,72	-	-
TO	CT35	11,01	4,44	0,0082	48,98	27,52	>100	31,99	34,41
	CT36	9,22	14,54	0,0041	95,16	10,29	0,17	21,56	
	CT37	31,29	29,14	0,0035	79,38	16,24	>100	42,67	
	CT38	>100	18,09	0,0024	12,49	18,08	>100	41,44	
	Média	37,88	16,55	0,0045	59,00	18,03	75,04	-	-
-	CT22	43,77	4,71	0,0043	99,81	16,36	91,61	42,71	45,78
	CT26	0,106	5,02	0,014	>100	33,58	>100	39,78	
	MF3	>100	3,66	0,0013	>100	25,41	>100	54,84	
	Média	47,95	4,46	0,0065	99,94	25,12	97,20	-	-
	Média Geral	41,42	6,72	0,051	62,19	21,18	59,55	-	-

Fonte: dados do autor.

Nota: Isol (Isolado), BA (Bahia), GO (Goiás), MT (Mato Grosso), PR (Paraná), RS (Rio Grande do Sul), TO (Tocantins), Manc (Mancozebe), Protio (Protioconazol), Azoxi + benz (Azoxistrobina +

benzovindiflupir), Piracló (Piraclostrobina), Piracló + epoxi + fluxa (Piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapíroxada) e Cipro (Ciproconazol). \* Isolado sem local identificado. >100 (dose estimada acima da dose mais alta).

(1) Em mg/L.

A variação média da  $CI_{50}$  dos fungicidas considerando todas as regiões foi maior para ciproconazol (104776%) e o menor para o protioconazol (2490%) (Tabela 5). Em ordem crescente, as variações foram menores para a piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapíroxada (7143%), azoxistrobina + benzovindiflupir (10050%), mancozebe (22078%) e maior para a piraclostrobina (61170%). A menor variação média para  $CI_{50}$  por região considerando todos os fungicidas foi do PR (1086%), seguido de RS (9610%), isolados sem identificação (16170%), TO (18841%), BA (20437%) e MT com a maior variação (139676%). Os valores de variação entre os isolados por estado partiram de 28 (isolados da BA para protioconazol) a 425948% (isolados do MT para piraclostrobina). Entre os fungicidas, mancozebe apresentou a menor variação de  $CI_{50}$  para BA e a maior para os isolados sem identificação (423 e 95758%, respectivamente), para protioconazol a menor variação ocorreu no estado da BA e a maior no RS (12747%). Para azoxistrobina + benzovindiflupir, o menor valor observado foi para PR (157%) e maior variação no RS, com 42043%. Para piraclostrobina a menor e maior variação nos valores ocorreram em PR (57%) e MT (425948%), enquanto que para piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapíroxada ocorreu para os isolados sem identificação (105%) e para BA (5201%). Para o fungicida ciproconazol os valores variaram entre 87 e 356300%, para os isolados sem identificação e MT, respectivamente.

Os valores de “p” e erro foram calculados para todos os isolados, sendo determinados para todas as  $CI_{50}$  em relação aos seis fungicidas (Tabelas 6 e 7). O fungicida mais potente foi a azoxistrobina + benzovindiflupir, com a menor  $CI_{50}$  média geral com 0,051 mg/L. O fungicida menos potente foi a piraclostrobina, com  $CI_{50}$  média geral de 62,19 mg/L. Com relação ao comportamento dos isolados, o que apresentou a maior sensibilidade foi CT10, com  $CI_{50}$  média (para todos os fungicidas) de 6,53 mg/L e o menos sensível foi MF3, com 54,84 mg/L. A  $CI_{50}$  para o isolado CT39 foi >100 mg/L,

enquanto para o CT7 foi de 0,04 mg/L para ciproconazol, ambos do MT (Apêndice II). Os isolados de TO apresentaram valores >100 mg/L para o ciproconazol, com exceção do CT36 com  $CI_{50}$  inferior de 0,17 mg/L. Assim como entre os isolados do RS, a  $CI_{50}$  de CT32 foi de 33,16 mg/L (moderadamente sensíveis), enquanto que para CT31 e CT34 foram >100 mg/L (baixa sensibilidade). Dessa forma, pode-se observar comportamentos distintos da sensibilidade de indivíduos da mesma população, oriundos da mesma região.

Tabela 5 - Amplitude da variação (1) por estado brasileiro da concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) do crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* a seis fungicidas. Passo Fundo – 2017

Estado	Manc	Protio	Azoxis + benzo	Piraclo	Piraclo+ epoxi + fluxa	Cipro	Média
BA	158	28	19400	927	5201	56909	20437
GO	2760	271	4800	443	477	210326	36504
MT	48594	3705	2733	425948	778	356300	139676
PR	4731	141	157	57	1160	272	1086
RS	423	12747	42043	95	2109	243	9610
TO	2123	556	242	662	167	109294	18841
-	95758	37	977	55	105	87	16170
Média	22078	2490	10050	61170	7143	104776	-

Fonte: dados do autor.

Nota: BA (Bahia), GO (Goiás), MT (Mato Grosso), PR (Paraná), RS (Rio Grande do Sul), TO (Tocantins), Manc (Mancozebe), Protio (Protioconazol), Azoxis + benzo (Azoxistrobina + benzovindiflupir), Piraclo (Piraclostrobina), Piraclo + epoxi + fluxa (Piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiróxada) e Cipro (Ciproconazol).

(1) Em %.

Tabela 6 - Valor de probabilidade e do erro da concentração inibitória de 50% do crescimento micelial (CI<sub>50</sub>) de *Colletotrichum truncatum* aos fungicidas mancozebe, protioconazol e azoxistrobina + benzovindiflupir. Passo Fundo – 2017

Estado	Isolado	Mancozebe		Protioconazol		Azox + benz	
		p	erro	p	erro	p	erro
BA	CT10	NA	NA	0,0000	1,04	0,0876	0,00
	CT12	0,8599	75,03	0,0000	0,87	0,2623	0,10
	CT24	0,8119	46,70	0,0001	0,87	0,3018	0,00
	CT9	0,9373	65,19	0,0524	1,92	0,1276	0,39
GO	CT13	0,9486	370,86	0,0000	1,45	0,1760	0,00
	CT14	NA	NA	0,0000	0,88	NA	NA
	CT17	NA	NA	0,0000	0,84	0,2429	0,00
	CT18	0,0000	10,37	0,0000	0,67	0,0877	0,00
	MF2	0,6560	8,13	0,0744	1,55	0,5684	0,11
MT	CT3	NA	NA	0,0011	1,49	0,1944	0,00
	CT39	0,9748	82,16	0,6161	0,39	0,4896	0,00
	CT4	NA	NA	0,0749	0,92	0,2377	0,00
	CT7	0,8604	3727,39	0,0110	1,27	0,0956	0,00
	MF1	0,5405	10,50	0,0330	1,07	0,2710	0,00
	MF4	0,9901	108,28	0,0000	1,43	0,6102	0,14
PR	CT28	0,0398	114,27	0,0000	1,01	0,1553	0,00
	CT40	0,5571	8,44	0,0000	2,32	0,1661	0,00
	CT41	0,0000	6,14	0,0006	2,52	0,2011	0,00
RS	CT31	0,2135	201,66	0,0921	0,03	0,3757	0,01
	CT32	0,2824	435,75	0,0000	1,36	0,2702	0,00
	CT34	0,0000	9,57	0,0000	0,81	0,8599	5,99
TO	CT35	0,9380	141,15	0,0000	0,95	0,3431	0,01
	CT36	NA	NA	0,0000	1,16	0,4012	0,00
	CT37	0,0000	6,03	0,0000	3,64	0,1730	0,00
	CT38	0,0371	96,39	0,0000	1,92	0,2222	0,00
-	CT22	0,0000	7,29	0,0000	0,84	0,2242	0,00
	CT26	0,7436	0,32	0,0000	0,70	0,4647	0,02
	MF3	0,0000	8,07	0,0000	0,71	0,1988	0,00

Fonte: dados do autor.

Nota: BA (Bahia), GO (Goiás), MT (Mato Grosso), PR (Paraná), RS (Rio Grande do Sul), TO (Tocantins), Azox + benz (Azoxistrobina + benzovindiflupir), NA (valores não ajustados). A faixa aceitável para p é até 0,05.

Tabela 7 - Valor de probabilidade e do erro da concentração inibitória de 50% do crescimento micelial (CI<sub>50</sub>) de *Colletotrichum truncatum* aos fungicidas piraclostrobina, piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada e ciproconazol. Passo Fundo – 2017

Estado	Isolado	Piraclostrobina		Piraclor+ epoxi + fluxa		Ciproconazol	
		p	erro	p	erro	p	erro
BA	CT10	0,2671	11,10	0,1474	0,05	0,8314	9,49
	CT12	0,0030	41,39	0,0085	12,20	0,8080	237,45
	CT24	0,0000	3,69	0,0016	2,88	0,7636	0,38
	CT9	0,0000	3,10	0,0003	1,20	0,0060	17,53
GO	CT13	0,0215	46,99	0,0592	30,08	0,6142	0,13
	CT14	0,0000	13,87	0,0092	8,94	0,0000	11,87
	CT17	0,0362	117,69	0,0187	10,99	0,6766	341,37
	CT18	0,0000	12,23	0,0000	2,18	0,0002	31,37
	MF2	0,0000	13,75	0,1693	13,86	0,0035	32,31
MT	CT3	0,0002	12,10	0,0322	4,02	0,6467	51,94
	CT39	0,0034	0,00	0,1089	38,85	0,0026	46,15
	CT4	0,0000	10,24	0,0014	3,13	0,0008	19,38
	CT7	0,5733	0,27	0,0864	19,68	0,5233	0,065
	MF1	0,0000	8,17	0,0039	3,70	0,0000	14,15
	MF4	0,0000	13,28	0,1451	4,88	0,9570	131,47
PR	CT28	0,0002	17,16	0,5482	4,20	0,0097	18,24
	CT40	0,0000	16,91	0,0000	3,25	0,8520	120,98
	CT41	0,0030	22,92	0,0032	4,97	0,0326	38,44
RS	CT31	0,5419	29,08	0,0179	29,07	0,2332	94,19
	CT32	0,0048	7,68	0,0010	1,83	0,0014	9,81
	CT34	0,0067	12,36	0,5294	5,08	0,0130	41,91
TO	CT35	0,6238	99,40	0,0065	9,81	0,0530	65,64
	CT36	0,0024	30,13	0,3808	11,67	0,9692	6,03
	CT37	0,0031	25,84	0,0144	6,47	0,0481	42,23
	CT38	0,0222	5,34	0,0121	7,01	0,0549	68,25
-	CT22	0,0042	33,32	0,0000	4,51	0,0798	51,25
	CT26	0,0004	40,58	0,0001	3,75	0,0486	50,91
	MF3	0,0000	26,94	0,0036	11,01	0,0021	52,86

Fonte: dados do autor.

Nota: Nota: BA (Bahia), GO (Goiás), MT (Mato Grosso), PR (Paraná), RS (Rio Grande do Sul), TO (Tocantins), Piraclor + epoxi + fluxa (Piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada), NA (valores não

ajustados). A faixa aceitável para p é até 0,05.

## **4.5 Discussão**

### **4.5.1 Patogenicidade de *Colletotrichum truncatum* à soja**

Para verificar a patogenicidade de *C. truncatum* à soja, o fungo foi inoculado em sementes e em órgãos aéreos. O fungo foi descrito em pimenta e relatada capacidade de infecção em 180 gêneros de 55 famílias botânicas (FARR et al., 2007).

Além do Brasil, a ocorrência da antracnose da soja causada por *C. truncatum* é de alta prevalência na Argentina (RAMOS et al., 2010), e outras países. Como a soja é cultivada em extensas áreas, investigações apontam que o fungo é comumente encontrado formando comunidades dominadas por poucas espécies de *Colletotrichum* spp., localizadas no tecido da haste das plantas em diferentes lugares como Estados Unidos (Minnesota) e no Brasil (Minas Gerais) (DEAN et al., 2017; FERNANDES et al., 2015).

Outros trabalhos apontam que *C. truncatum* atualmente pertence ao grupo de *C. destructivum* O'Gara (MENAT et al., 2012), juntamente com *C. graminicola* (Ces.) Wilson (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2007), *C. dematium* (Pers.) Grove (DAMM et al., 2009) e *C. acutatum* Simmonds (THAN et al., 2008), sendo, portanto, patogênico à leguminosas (lentilha, amendoim, ervilha, feijão, etc.) (SOUSA et al., 2017) e solanáceas (CANNON et al., 2012).

### **4.5.2 Determinação *in vitro* da sensibilidade de isolados de *Colletotrichum truncatum* a fungicidas**

A sensibilidade do fungo está associada a sua região geográfica de origem, sendo que os isolados de mesma origem podem apresentar comportamento semelhante, ocorrendo uma alta diversidade genética entre os isolados (SHARMA; PINNAKA; SHENOY, 2014). Em outros estudos, isolados provenientes de oito localidades do

Japão e uma dos Estados Unidos (isolados obtidos durante vários anos), apresentaram respostas similares para os fungicidas entre os isolados da mesma região (ISHII et al., 2016). Essa mesma hipótese foi levantada em outra investigação, em que a origem tem influência sobre as relações entre as populações do fungo, e dessa forma, a doença deve ser manejada diferentemente dependendo das diferentes populações. Isolados originados de 13 regiões que representam as principais áreas de produção de pimenta na China, confirmaram que as populações do sul e do norte têm comportamento distinto (DIAO et al., 2015).

Um agrupamento em relação à morfologia e crescimento do fungo foi observado em isolados de diferentes regiões da Malásia, quanto às características do micélio, formando dois grupos, com caracteres diferentes, em relação à coloração e tipo da colônia, sendo que a origem dos isolados pertencentes a cada grupo era comum, ou seja, os isolados da mesma região tinham características morfológicas iguais (MAHMODI; KADIR; PUTEH, 2014). Para isolados coletados em cinco regiões do México foram determinadas diferenças morfológicas, genéticas e patogênicas dando origem a 20 grupos de acordo com a morfologia e sua localização (CALZADA et al., 2017).

A variação genética entre isolados originários da soja de *C. truncatum* provenientes de diferentes estados brasileiros (SANT'ANNA, et al., 2010), já foi observada em outros estudos. A partir de 51 isolados de 11 estados do país, provenientes de plantas de soja, associados com isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de outras espécies vegetais, foi demonstrado que *C. truncatum* era o único agente causal da antracnose da soja no Brasil até 2007, com variabilidade genética, morfológica e patogênica relevante, bem como uma ampla distribuição geográfica. Além disso, formaram-se subgrupos de acordo com regiões específicas em relação à origem do isolado, indicando a existência de um mecanismo altamente eficiente de dispersão do patógeno em longas distâncias, reforçando o papel das sementes como fonte primária de inóculo da doença (ROGÉRIO et al., 2016) e conseqüente da homogeneidade na população do fungo.



A informação sobre os graus de diversidade genética entre as populações de *C. truncatum* de diferentes hospedeiros e países poderia contribuir para elaborar estratégias efetivas de manejo, considerando entre tantos fatores a resistência do hospedeiro (KATOCH; PRABHAKAR; SHARMA, 2016) e também, o potencial patogênico do fungo (VELHO et al., 2015). A importância da antracnose como fator limitante de produção da soja é extrema, com função matemática de dano, normalizada para 1000 kg/ha, foi  $R = 1000 - 18,92 IV$ , com  $R^2 = 0,8485$ , onde R é o rendimento de grãos e IV a incidência em vagens (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016). Destaca-se o controle químico como método mais eficaz de controle da antracnose, porém, a limitação deve ser considerada, devido ao maior risco de diminuição da sensibilidade do fungo (DEAN et al., 2012).

A sensibilidade do fungo é distinta dependendo da região, pois, de acordo com o ambiente e principalmente da aplicação do fungicida, a resposta do fungo varia. Portanto, é necessário combinar ou alternar fungicidas de mecanismos de ação diferentes como estratégias de gestão para prevenir o desenvolvimento de patógenos resistentes a fungicidas, uma vez que é um dos problemas mais significativos de manejo químico de doenças. O uso intensivo e repetido de um único fungicida elimina indivíduos sensíveis da população e apenas a parte resistente sobrevive e multiplica e torna-se dominante (WEDGE et al., 2007). Pesquisas sobre a seleção de mutações específicas ou genótipos resistentes em populações de patógenos em resposta a tratamentos com fungicidas, podem ser utilizadas para determinar estratégias mais eficazes a fim de reduzir ou prevenir a resistência.

A determinação da resistência baseada em evidências científicas sólidas é vital para prolongar a vida efetiva dos fungicidas e manter seu uso futuro na proteção das culturas (LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2015). O fungicida que apresentou a maior inibição do crescimento de isolados estudados foi à associação entre azoxistrobina com benzovindiflupir (estrobilurina ou IQE e carboxamida ou ISDH). Outras publicações reportaram resultados indicando que o ingrediente ativo benzovindiflupir apresentou maior atividade inibitória do que outros princípios ativos do mesmo grupo químico (ISHII et al., 2016), dentre eles a fluxapiroxada, que obteve alto valor de  $CI_{50}$ , o mesmo

para azoxistrobina, obtendo melhor desempenho no controle do fungo quando comparado a piraclostrobina (ALTAMIRANO et al., 2017; CHEN; JIN; ZHO, 2009).

A utilização de fungicidas com o mesmo mecanismo de ação, sem alternar princípios ativos, aumenta a redução da sensibilidade do fungo, acarretando a diminuição do controle da doença. É observada a diferença de controle dos grupos químicos mais utilizados, como triazóis (IDM) (ZHANG et al., 2017) e estrobilurinas (IQe) (YOKOSAWA et al., 2017), destacando o ciproconazol e a piraclostrobina (SAMUELIAN et al., 2014) com utilização isolada. Contudo, outras investigações apresentam diferenças no controle do fungo entre ingredientes ativos pertencentes ao mesmo grupo químico (GREER et al., 2011), como foi citado para o protioconazol (IDM), apresentando baixo valor de  $CI_{50}$  (WEEMS; BRADLEY, 2017; WISE et al., 2011).

Outros fungicidas pertencentes ao grupo químico multissítios são eficazes no controle do fungo, dados apontam para até 100% de inibição micelial do fungo para mancozebe e clorotalonil (BIJU et al., 2017), sendo que a redução da sensibilidade do fungo para esse grupo químico demonstra ser mais lenta, pois o mecanismo de resistência envolvido para mancozebe está ligado à seleção restritiva associada a condições ambientais (HE et al., 2017).

A dificuldade no controle químico observada mediante dos valores de  $CI_{50}$  para o centro-sul do país deve-se a combinação de fatores que somados contribuem para acelerar o processo de redução da sensibilidade do fungo, pois a variação no controle de isolados está ligada à variação na localização de origem (RAMDIAL; HOSEIN; RAMPERSAD; 2016; YOKOSAWA et al., 2017). Dados do cenário brasileiro em relação ao manejo químico apontam que ocorreu variação no número de aplicações de fungicidas da safra 15/16 para 16/17, aumentando em média no Brasil 2,9% e nas regiões, Cerrado (+4,7%), Sul (+6,8%) e Centro (+12,4%), com exceção da região Centro sul (-4,5%). A utilização de misturas comerciais aumentou no país em 3,5%, e nas regiões do Cerrado em 5,5%, Centro sul em 1,3%, Sul 6,5% e Centro 1,1%. Ocorreu aumento na utilização dos fungicidas, de 17% em 15/16 para 23% em 16/17 nas

aplicações em estágio vegetativo e de 25% para 27% no reprodutivo. A utilização de fungicidas protetores (multissítios) no Brasil cresceu de 6% na safra 14/15 para 38% em 16/17. Na safra 15/16, o estado com maior número médio de aplicações foi a Bahia (1,95) e o menor foi Minas Gerais (1,13) (SPARK, 2017).

A antracnose no Brasil teve incidência maior na safra 16/17 (17,5%) do que na anterior 15/16 (12,4%), variando nas regiões Sul (5% em 15/16 para 3% em 16/17), Centro (12,8% em 15/16 para 21,6% em 16/17) e Norte (37,5% em 15/16 para 33 em 16/17) (SPARK, 2017), indicando que a doença necessita de um manejo químico eficiente para controle. As populações de *C. truncatum* vêm tendo redução da sensibilidade aos fungicidas ao longo dos anos e em curto prazo não é relatado inovações em relações a incrementos com a utilização de novas moléculas. Em linhas gerais, não se tem perspectivas de alternativas, como novos ingredientes ativos para o controle químico, pois pesquisas e inovação demanda tempo, e enquanto isso, o fungo reduz a sensibilidade aos fungicidas pelo processo de adaptação.

#### **4.6 Conclusões**

Os isolados de *C. truncatum* da Bahia e do Mato Grosso apresentam as menores  $CI_{50}$  e a maior para os isolados sem identificação e do Rio Grande do Sul. Analisando os demais valores, percebe-se que quanto mais ao norte e centro do país a  $CI_{50}$  tende a ser menor do que as determinadas para estados ao sul, indicando variabilidade na sensibilidade de acordo com a origem do isolado. Os fungicidas com ingredientes ativos isolados piraclostrobina e ciproconazol apresentam as  $CI_{50}$  maiores, do que os fungicidas utilizados em mistura comercial.

Com relação ao comportamento dos isolados, o que apresenta a maior sensibilidade foi o CT10, com  $CI_{50}$  média (entre todos os fungicidas) de 6,53 mg/L e o isolado menos sensível foi MF3, com 54,84 mg/L. O fungicida com maior fungitoxicidade foi azoxistrobina + benzovindiflupir, com  $CI_{50}$  média com 0,051 mg/L e o fungicida menos potente foi piraclostrobina, com a maior  $CI_{50}$  média geral de 62,19 mg/L. A sensibilidade do fungo varia de acordo com a origem e mecanismo de ação do

fungicida. Dessa forma, o controle do fungo irá alterar-se em função do ambiente e do fungicida utilizado.

## 5 CAPÍTULO III

Comparação de três métodos de cálculo da  $CI_{50}$  de fungicidas para isolados de soja de *Colletotrichum truncatum in vitro*.

### 5.1 Resumo

A sensibilidade de um fungo, ou a fungitoxicidade de um fungicida, é medida pela  $CI_{50}$ , (concentração inibitória de 50% do crescimento micelial) sendo determinada a partir do contato de um fungo com o fungicida. Para calcular a  $CI_{50}$  podem ser usados diferentes métodos e modelos matemáticos, como análise de regressão linear ou logarítmica, que pode resultar em diferenças entre os valores obtidos. Portanto, é necessária a comparação da precisão entre os diferentes métodos e programas disponíveis para cálculo da  $CI_{50}$ . O objetivo do presente trabalho foi comparar a  $CI_{50}$  de fungidas para isolados de *Colletotrichum truncatum*, obtidas por três métodos de regressão. Foram utilizados dois isolados do fungo e 26 fungicidas, com delineamento experimental foi inteiramente casualizado e delineamento de tratamentos do tipo bifatorial. As unidades experimentais foram placas de Petri (79,4 mm de diâmetro) e quatro repetições. Os dados de inibição do crescimento micelial, foram submetidos à regressão por três programas computacionais (Microsoft Excel, RStudio e Infostat) para determinar a  $CI_{50}$ . A determinação feita pelo programa RStudio apresentou menor variação e com valores menores da  $CI_{50}$  do que os calculados com os programas Microsoft Excel e Infostat.

Palavras-chave: 1. Antracnose. 2. Concentração inibitória. 3. Regressão matemática. 4. Sensibilidade.

### 5.2 Introdução

A medida da sensibilidade de um fungo à um fungicida pode ser usada na identificação do produto mais eficaz para ser usado no controle de um fungo fitopatogênico. A sensibilidade de um fungo, ou a fungitoxicidade de um fungicida, é medida pela  $CI_{50}$ . A  $CI_{50}$  é a concentração de ingrediente ativo de um fungicida que resulta na metade do efeito máximo esperado (controle). Refere-se à concentração na qual um fungicida induz uma resposta na metade entre a taxa inicial e a máxima após

um tempo especificado de exposição. É usada normalmente como medida da potência de uma droga (REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 26).

A  $CI_{50}$  do crescimento micelial ou da germinação de esporos é determinada a partir do contato de um fungo com o fungicida e serve para verificar e comparar a potência de diferentes fungicidas. Em experimentos *in vitro* geralmente são utilizados cinco a sete concentrações (ingrediente ativo) de fungicidas comerciais para determinar o valor dessa variável, obtido pela análise de regressão entre as concentrações da droga e da inibição resultante (ECHEVERRIA; GUTIÉRREZ; CARMONA, 2017; FAN et al., 2017).

Os principais fungicidas usados no controle de doenças em soja pertencem a cinco mecanismos de ação: inibidor da desmetilação (IDM) ou triazol, inibidor da quinona externa (IQe) ou estrobilurina, inibidor da succinato desidrogenase (ISDH) ou carboxamida, inibidor da síntese da tubulina (IST) ou benzimidazol e interferência generalizada nas funções celulares ou multissítios (não específicos) (FRAC, 2017; REIS; REIS; CARMONA, 2010, p. 58-75). Diferentemente da sensibilidade dos fungos os mecanismos de ação de um grupo químico não se alteram ao longo do tempo de uso (BESTOR; ROBERTSON; MUELLER, 2011). No entanto, alguns grupos químicos apresentam alto risco quanto desenvolvimento de populações dos fungos resistentes como as estrobilurinas e carboxamidas, enquanto outros apresentam risco médio, como triazóis e benzimidazol e de baixo risco como os multissítios (PEREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009; RODRIGUES, 2006).

Para calcular a  $CI_{50}$  são usados diferentes métodos e modelos matemáticos, como análises de regressão (JIANG; KOPP-SCHNEIDER, 2014; ROBERTI et al., 2017). As respostas entre inibição do patógeno e as concentrações do produto químico são indeterminadas, pois as relações biológicas envolvidas podem ser influenciadas por inúmeros fatores. A interpretação da resposta obtida a partir da inibição ou crescimento micelial é feita a partir da análise de regressão, podendo ser linear ou de outra ordem (CASTILLO et al., 2010; ESTEVE-TURRILLAS et al., 2017). A regressão linear considera inibições contra concentrações e calculado os valores de  $CI_{50}$  ajustando os

dados de dose-resposta a uma linha reta e aplicando a fórmula de regressão linear ( $y = a + bx$ ), obtendo o ponto de inibição de 50% do crescimento micelial ligando a dose do produto (LYNCH et al., 2017; PRICKAERTS et al., 2017). Em outros estudos, os dados apontaram que os métodos de cálculo podem influenciar na precisão dos valores obtidos para a  $CI_{50}$  (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013).

A hipótese que se formulou é de que a  $CI_{50}$  difere conforme o programa e métodos computacionais utilizados para calculá-la. Portanto, é necessária a comparação da precisão e adequação dos diferentes métodos e programas utilizados para cálculo e determinação das respostas.

O objetivo do presente trabalho foi quantificar a fungitoxicidade de ingredientes ativos isolados ou em misturas comparando dados da  $CI_{50}$  de isolados de *Colletotrichum truncatum*, da soja, analisados por três métodos de regressão, com programas computacionais.

### 5.3 Material e Métodos

Foram selecionadas duas populações monospóricas de *C. truncatum*, isolados de plantas de lavouras de soja na safra de 2015/16, do estado de Mato Grosso (MT) e do Rio Grande do Sul (RS) (Tabela 1). Testou-se 26 fungicidas com cinco mecanismos de ação distintos: estrobilurina (IQe), triazol (IDM), carboxamida (ISDH), benzimidazol (IST) e multissítios, puros ou em misturas comerciais (Tabela 2). Os dados dos diâmetros (mm) das colônias foram submetidos à análise estatística, pelo método de regressão linear e logarítmica, determinando o valor da  $CI_{50}$  com três programas estatísticos: Microsoft Excel (versão 2013, Microsoft Corporation), RStudio (RSTUDIO, 2015) e InfoStat (RIENZO et al., 2013).

Tabela 1 - Descrição dos isolados de *Colletotrichum truncatum*. Passo Fundo – 2016

Código	Município	Estado	Data de coleta	Cultivar
CT6	Claúdia	Mato Grosso	29/01/2016	BMG Desafio RR
CT21	Almirante Tamandaré do Sul	Rio Grande do Sul	31/01/2016	DM54I52 IPRO

Fonte: dados do autor.

Tabela 2 - Fungicidas utilizados para determinar a fungitoxicidade a dois isolados de *Colletotrichum truncatum* provenientes de duas regiões distintas do Brasil. Passo Fundo – 2016

Ingrediente ativo	Nome comercial	Concentração (1)	Mecanismo de ação
Azoxistrobina	Priori	250	IQe
Piraclostrobina	Comet	250	IQe
Picoxistrobina	Oranis	250	IQe
Trifloxistrobina	Flint 500 WG	500	IQe
Protioconazol	-	250	IDM
Ciproconazol	Alto 100	100	IDM
Tebuconazol	Folicur200 EC	200	IDM
Carbendazim	Carbendazim	500	IST
Benzovindiflupir	Solatenol	100	ISDH
Fluxapiroxada	-	300	ISDH
Oxicloreto de cobre	Difere	588	Multissítio
Mancozebe	Unizeb Gold	750	Multissítio
Clorotalonil	Previnil SC	730,6	Multissítio
Piraclostrobina + fluxapiroxada	Orkestra SC	167 +333	IQe + ISDH
Piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada	Ativum EC	50 + 81 +50	IQe+ IDM + ISDH
Protioconazol + trifloxistrobina	Fox	150 +175	IDM + IQe
Trifloxistrobina + protioconazol + bixafeno	Fox Xpro	15 + 17,5 +12,5	IQe + IDM + ISDH
Azoxistrobina + benzovindiflupir	Elatus	300 + 150	IQe + ISDH
Tebuconazol + picoxistrobina	Horos	200 +120	IDM + IQe
Tebuconazol + mancozebe + picoxistrobina	Cronnos	40 + 40 +600	IDM + Multissítio + IQe
Ciproconazol + picoxistrobina	Approach Prima	200 + 80	IDM + IQe
Ciproconazol + trifloxistrobina	Sphere Max	375 +160	IDM + IQe
Epoxiconazol + piraclostrobina	Abacus SC	160+260	IDM + IQe
Epoxiconazol + cresoxim-metílico	Guapo	125 +125	IDM + IQe
Ciproconazol + azoxistrobina	Priori Xtra	80 + 200	IDM + IQe



Fonte: dados do autor.

Nota: SC (Suspensão concentrada), EC (Emulsão concentrada), WG (Granulado dispersível), IQe (estrobilurina), IDM (triazol), IST (benzimidazol) e ISDH (carboxamida).

(1) Em g/L ou kg/L.

Como meio de cultura foi utilizado uma composição pronta de potato, dextrose e agar (PDA), 39 g/L de água, agitada por um minuto e autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Não foi adicionado ao substrato o ácido salicílico droxamico (SHAM) com base no relato de Vincelli e Dixon (2002). Para a determinação da  $CI_{50}$  foram testadas concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 40 mg/L e 0 (testemunha, sem fungicida). A partir da concentração na formulação comercial, foram obtidas por duas diluições de suspensões estoques em água destilada as concentrações desejadas. Os valores referem-se à concentração final no substrato.

A partir de isolamentos monospóricos (ALFENAS; MAFIA, 2007), colônias do fungo foram obtidas em placas contendo BDA crescidas a  $25 \pm 2$  °C sob luz contínua e incubado durante dez dias. Após foi recortado com um furador de folhas, de três mm de diâmetro, um disco e colocado no centro da placa, sobre o substrato e incubado (temperatura de  $28 \pm 2$  °C sob luz contínua) até que o crescimento do fungo na testemunha atingisse a borda da placa. As colônias desenvolvidas nos diferentes tratamentos tiveram o diâmetro (mm) medido com um paquímetro digital. As unidades experimentais foram constituídas por placas de Petri com 79,4 mm de diâmetro, distribuídas em tratamentos completamente casualizados com quatro repetições.

## 5.4 Resultados

Em relação ao grupo IQe, a azoxistrobina, a  $CI_{50}$  dos isolados CT6 e CT21 foi distinta entre os métodos, enquanto que para a piraclostrobina a  $CI_{50}$  foi semelhante (Tabela 3). Para a picoxistrobina, o isolado CT21 apresentou  $CI_{50}$  igual para RStudio (RSt) e InfoStat (IFt) ( $>40$  mg/L), porém, para CT6, as  $CI_{50}$  diferiram entre os três métodos (entre  $<0,01$  e 27,59 mg/L). Para a trifloxistrobina, os dois isolados

apresentaram  $CI_{50}$  igual para RSt e IFt ( $>40$  mg/L), mas não quando calculado com o programa Microsoft Excel (MEx), que não determinou valor (ns).

Para o grupo IDM, ciproconazol e protioconazol os valores da  $CI_{50}$  foram semelhantes entre os métodos para o isolado CT21, porém para o isolado CT6 houve semelhança somente entre o RSt e o IFt (Tabela 4). Para o tebuconazol, o isolado CT21 apresentou  $CI_{50}$  semelhante para MEx e RSt (5,6 e 8,84 mg/L, respectivamente), mas diferente para IFt (19,91 mg/L). Já para o isolado CT6, os métodos RSt (11,41 mg/L) e IFt (13,59 mg/L) apresentaram  $CI_{50}$  semelhante, diferindo de MEx (2,5 mg/L).

Para ISDH, a  $CI_{50}$  foi semelhante entre os métodos (Tabela 5), sendo que para o benzovindiflupir a  $CI_{50}$  foi semelhante para os dois isolados tanto para MEx (0,5 mg/L para os dois isolados) quanto para RSt (CT21 0,02271 e CT6 0,00425 mg/L). Para a fluxaproxada a mesma  $CI_{50}$  foi obtida para RSt e IFt ( $>40$  mg/L) para ambos os isolados, diferindo apenas para MEx (ns). Para o carbendazim, do grupo do IST, os valores foram semelhantes entre os três métodos para os dois isolados, com  $CI_{50}$  de 0,01 mg/L para CT21 e de 35,00 mg/L para CT6.

Quanto aos fungicidas multissítios, para o clorotalonil houve diferença da  $CI_{50}$  entre os três métodos para CT21 e similaridade para CT6 entre MEx e RSt, com 4,3 e 2,58 mg/L, mas diferente para IFt, com 38,98 mg/L. Para o mancozebe, a  $CI_{50}$  foi igual entre todos os métodos para CT21 ( $>40$  mg/L) e para CT6, RSt e IFt foram semelhantes (de 14,66 a 14,79 mg/L, respectivamente) diferindo de MEx (ns). Para o oxicloreto de cobre houve disparidade entre os três métodos para CT21, com 'ns' para MEx, 5,51 mg/L para RSt e  $>40$  mg/L para IFt. Já, para CT6, os métodos RSt e IFt apresentaram  $CI_{50} > 40$  mg/L, diferindo de MEx (ns).

Em relação as misturas comerciais com IQe, para o protioconazol + trifloxistrobina houve semelhança da  $CI_{50}$  entre MEx e IFt ( $>40$  mg/L) para CT21, mas não para RSt (5,22 mg/L) e diferindo entre os três métodos para CT6 (Tabela 6). Para o tebuconazol + picoxistrobina, a  $CI_{50}$  foi igual entre RSt e IFt para CT21 e entre MEx e RSt para CT6. O tebuconazol + mancozebe + picoxistrobina, apresentou  $CI_{50}$  diferente

entre os três métodos para CT21 e iguais para CT6, com >40 mg/L para RSt e IFt. Ciproconazol + azoxistrobina, apresentou CI<sub>50</sub> não ajustadas para os três métodos, sendo que >40 mg/L para IFt, ns para MEx e NA para RSt, para os dois isolados. Para ciproconazol + picoxistrobina, diferiu para CT21, com 1,64 a >40 mg/L, e CT6 com CI<sub>50</sub> igual para RSt e IFt (>40 mg/L). O ciproconazol + trifloxistrobina, apresentou diferenças entre os três métodos para os dois isolados. Para o epoxiconazol + piraclostrobina, a CI<sub>50</sub> de CT21 foi 7,3 mg/L para MEx e 3,09 para RSt e de 24,55 mg/L para IFt e para CT6 e de 24,22 e 27,84 mg/L para RSt e IFt, respectivamente, e para MEx >40 mg/L. O epoxiconazol + cresoxim-metílico, apresentou valores semelhantes para CT21 entre dois métodos (MEx e RSt), e diferente para IFt (18,44 mg/L), já para CT6, a CI<sub>50</sub> foi igual entre os três métodos (>40 mg/L).

Para as misturas comerciais com ISDH, piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada apresentaram CI<sub>50</sub> semelhante entre MEx (>40 mg/L) e IFt (34,59 mg/L) para CT21 e igual entre todos os métodos para CT6 (>40 mg/L) (Tabela 7). Para piraclostrobina + fluxapiroxada, a CI<sub>50</sub> foi igual para MEx e IFt independente do isolado. A azoxistrobina + benzovindiflupir, apresentou CI<sub>50</sub> semelhante para os dois isolados entre os três métodos, assim como trifloxistrobina + protioconazol + bixafeno com exceção de CT21 para o método MEx.

Tabela 3 - Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) (1) do crescimento micelial de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* estimada por três métodos de regressão para fungicidas IQe (estrobilurina). Passo Fundo – 2017

(Continua)

Fungicidas	Isolados					
	CT21			CT6		
	Métodos					
	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat
	IQe					
Azoxistrobina	y=2,244ln(x)+8,777 R <sup>2</sup> = 0,947 IC <sub>50</sub> : ns	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : 19,45	y=104,93-1,34x p = 0,0055 R <sup>2</sup> = 0,36 IC <sub>50</sub> : >40	y=1,043ln(x)+9,403 R <sup>2</sup> = 0,160 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,9850 Error = 291,06 IC <sub>50</sub> : 5,51	y=21,11-0,17x p = 0,6574 R <sup>2</sup> = 0,01 IC <sub>50</sub> : >40

Tabela 3 - Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) (1) do crescimento micelial de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* estimada por três métodos de regressão para fungicidas IQe (estrobilurina). Passo Fundo – 2017

(Conclusão)

Fungicidas	Isolados					
	CT21			CT6		
	Métodos					
	Microsoft Excel	RStudio	Infostat	Microsoft Excel	RStudio	Infostat
	IQe					
Piraclostrobina	y = 4,298ln(x) + 15,27 R <sup>2</sup> = 0,818 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,9187 Error = 302,95 IC <sub>50</sub> : 31,162	y=70,90-0,35x p = 0,0063 R <sup>2</sup> = 0,35 IC <sub>50</sub> : >40	y = 4,175ln(x) + 27,20 R <sup>2</sup> = 0,844 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,1064 Error = 49,12 IC <sub>50</sub> : >40	y=57,55-0,55x p = 0,0003 R <sup>2</sup> = 0,53 IC <sub>50</sub> : 32,45
Picoxistrobina	y = 0,728ln(x) + 4,733 R <sup>2</sup> = 0,429 IC <sub>50</sub> : ns	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : >40	y=149,28-1,84x p = 0,08994 R <sup>2</sup> = 0,15 IC <sub>50</sub> : >40	y = 1,786ln(x) + 10,55 R <sup>2</sup> = 0,435 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,9725 Error = 794,23 IC <sub>50</sub> : 27,59	y=34,42-0,37x p = 0,3316 R <sup>2</sup> = 0,05 IC <sub>50</sub> : <0,01
Trifloxistrobina	y = 0,205ln(x) + 4,699 R <sup>2</sup> = 0,116 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0 Error: 6,29e <sup>+38</sup> IC <sub>50</sub> : >40	y=68,61-0,10x p = 0,2507 R <sup>2</sup> = 0,07 IC <sub>50</sub> : >40	y = -0,83ln(x) + 4,005 R <sup>2</sup> = 0,826 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0 Error = 1,10e <sup>+47</sup> IC <sub>50</sub> : >40	y=73,42-0,08x p = 0,0942 R <sup>2</sup> = 0,15 IC <sub>50</sub> : >40

Fonte: dados do autor.

Nota: IQe (estrobilurina), NA e ns (não ajustado, significando que a curva não foi totalmente ajustada para determinar a dose). > 40: concentração estimada acima da dose mais alta. <0,01: concentração estimada abaixo da dose mais baixa.

(1) Em mg/L.

Tabela 4 - Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) (1) do crescimento micelial de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* estimada por três métodos de regressão para fungicidas IDM (triazol). Passo Fundo – 2017

Fungicidas	Isolados					
	CT21			CT6		
	Métodos					
	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat
	IDM					
Ciproconazol	y = 3,883ln(x) + 19,56 R <sup>2</sup> = 0,743 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,1092 Error = 97,05 IC <sub>50</sub> : >40	y=68,07- 0,51x p = 0,0008 R <sup>2</sup> = 0,48 IC <sub>50</sub> : >40	y = 2,863ln(x) + 5,812 R <sup>2</sup> = 0,861 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,5466 Error: 707,86 IC <sub>50</sub> : >40	y=67,94- 0,39x p =0,0003 R <sup>2</sup> = 0,52 IC <sub>50</sub> : >40
Protioconazol	y = 5,553ln(x) + 29,34 R <sup>2</sup> = 0,861 IC <sub>50</sub> : 41,3	p = 0,0058 Error = 10,6955 IC <sub>50</sub> : 31,4590	y=65,23- 0,81x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,61 IC <sub>50</sub> : 31,52	y = 8,160ln(x) + 41,70 R <sup>2</sup> = 0,895 IC <sub>50</sub> : 2,8	p = 0,0030 Error = 2,1020 IC <sub>50</sub> : 6,72	y=55,56- 1,09x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,71 IC <sub>50</sub> : 14,55
Tebuconazol	y = 8,973ln(x) + 34,47 R <sup>2</sup> = 0,846 IC <sub>50</sub> : 5,6	p = 0,000 Error = 0,8608 IC <sub>50</sub> : 8,84	y=66,78- 1,36x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,81 IC <sub>50</sub> : 19,91	y = 7,706ln(x) + 42,96 R <sup>2</sup> = 0,813 IC <sub>50</sub> : 2,5	p = 0,000 Error = 1,3382 IC <sub>50</sub> : 11,41	y=56,01- 1,20x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,90 IC <sub>50</sub> : 13,59

Fonte: dados do autor.

Nota: IDM (triazol), NA e ns (não ajustado, significando que a curva não foi totalmente ajustada para determinar a dose). > 40: concentração estimada acima da dose mais alta. <0,01: concentração estimada abaixo da dose mais baixa.

(1) Em mg/L.

Tabela 5 - Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) (1) do crescimento micelial de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* estimada por três métodos de regressão para fungicidas ISDH (carboxamida), IST (benzimidazol) e multissítios. Passo Fundo – 2017

Fungicidas	Isolados					
	CT21			CT6		
	Métodos					
	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat
	ISDH					
Benzovindiflupir	y = 10,37ln(x) + 56,63 R <sup>2</sup> = 0,857 IC <sub>50</sub> : 0,5	p = 0,6215 Error = 0,0456 IC <sub>50</sub> : 0,02271	y=45,46-0,93x p = 0,0163 R <sup>2</sup> = 0,28 IC <sub>50</sub> : 6,19	y = 7,854ln(x) + 56,11 R <sup>2</sup> = 0,922 IC <sub>50</sub> : 0,5	p = 0,2676 Error: 0,00377 IC <sub>50</sub> : 0,00425	y=42,50-0,71x p = 0,0136 R <sup>2</sup> = 0,29 IC <sub>50</sub> : 3,94
Fluxapiroxada	y = 2,529ln(x) + 8,416 R <sup>2</sup> = 0,876 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,8795 Error = 834,39 IC <sub>50</sub> : >40	y=73,53-0,33x p = 0,0001 R <sup>2</sup> = 0,56 IC <sub>50</sub> : >40	y = 0,790ln(x) + 8,898 R <sup>2</sup> = 0,606 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,9885 Error = 11806 IC <sub>50</sub> : >40	y=69,07-0,13x p = 0,1402 R <sup>2</sup> = 0,12 IC <sub>50</sub> : >40
	IST					
Carbendazim	y = 8,459ln(x) + 69,97 R <sup>2</sup> = 0,660 IC <sub>50</sub> : 0,1	p = 0,0482 Error: 0,00086 IC <sub>50</sub> : 0,001322	y=32,00-0,68x p = 0,0683 R <sup>2</sup> = 0,17 IC <sub>50</sub> : <0,01	y = 4,945ln(x) + 30,59 R <sup>2</sup> = 0,721 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,1746 Error = 23,38 IC <sub>50</sub> : 38,61	y=58,10-0,61x p = 0,0019 R <sup>2</sup> = 0,42 IC <sub>50</sub> : 30,16
	Multissítios					
Clorotalonil	y = 2,623ln(x) + 16,71 R <sup>2</sup> = 0,954 IC <sub>50</sub> : 17,0	p = 0,9625 Error = 23,38 IC <sub>50</sub> : 1,11	y=67,10-0,34x p = 0,0015 R <sup>2</sup> = 0,44 IC <sub>50</sub> : >40	y = 4,231ln(x) + 31,51 R <sup>2</sup> = 0,988 IC <sub>50</sub> : 4,3	p = 0,9063 Error = 21,74 IC <sub>50</sub> : 2,58	y=59,58-0,51x p = 0,0002 R <sup>2</sup> = 0,53 IC <sub>50</sub> : 38,98
Mancozebe	y = 4,888ln(x) + 24,01 R <sup>2</sup> = 0,889 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,2408 Error = 105,775 IC <sub>50</sub> : >40	y=65,05-0,53x p = 0,0011 R <sup>2</sup> = 0,45 IC <sub>50</sub> : >40	y = 7,524ln(x) + 39,97 R <sup>2</sup> = 0,583 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0 Error = 2,032 IC <sub>50</sub> : 14,66	y=61,30-1,46x p = 0,0001 R <sup>2</sup> = 0,92 IC <sub>50</sub> : 14,79
Oxicloreto de Cobre	y = 1,749ln(x) + 10,73 R <sup>2</sup> = 0,687 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,9515 Error = 89,868 IC <sub>50</sub> : 5,51	y=72,42-0,30x p = 0,0014 R <sup>2</sup> = 0,44 IC <sub>50</sub> : >40	y = 2,238ln(x) + 11,20 R <sup>2</sup> = 0,672 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,9467 Error = 750,38 IC <sub>50</sub> : >40	y=66,31-0,23x p = 0,0949 R <sup>2</sup> = 0,15 IC <sub>50</sub> : >40

Fonte: dados do autor.

Nota: ISDH (carboxamida), IST (benzimidazol), NA e ns (não ajustado, significando que a curva não foi totalmente ajustada para determinar a dose). > 40: concentração estimada acima da dose mais alta. <0,01: concentração estimada abaixo da dose mais baixa.

(1) Em mg/L.

Tabela 6 - Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) (1) do crescimento micelial de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* estimada por três métodos de regressão para fungicidas mituras comerciais com IQe. Passo Fundo – 2017

(Continua)

Fungicidas	Isolados					
	CT21			CT6		
	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat
	Misturas comerciais com IQe					
Protioconazol + trifloxistrobina	y = 4,083ln(x) + 15,97 R <sup>2</sup> = 0,944 IC <sub>50</sub> : >40	p = 132,4163 Error: 0,9688 IC <sub>50</sub> : 5,22	y=69,97-0,26x p = 0,0384 R <sup>2</sup> = 0,22 IC <sub>50</sub> : >40	y = 1,531ln(x) + 16,29 R <sup>2</sup> = 0,441 IC <sub>50</sub> : ns	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : 18,37	y=62,78-0,12x p = 0,3211 R <sup>2</sup> = 0,05 IC <sub>50</sub> : >40
Tebuconazol + picoxistrobina	y = 3,549ln(x) + 9,042 R <sup>2</sup> = 0,802 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,7865 Error = 499,62 IC <sub>50</sub> : >40	y=75,50-0,56x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,86 IC <sub>50</sub> : >40	y = 4,493ln(x) + 18,72 R <sup>2</sup> = 0,683 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,000 Error = 10,50 IC <sub>50</sub> : >40	y=67,56-0,75x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,82 IC <sub>50</sub> : 37,15
Tebuconazol + mancozebe + picoxistrobina	y = 3,062ln(x) + 14,64 R <sup>2</sup> = 0,838 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,1308 Error = 9,5595 IC <sub>50</sub> : 14,79	y=69,87-0,32x p = 0,0129 R <sup>2</sup> = 0,30 IC <sub>50</sub> : >40	y = 0,356ln(x) + 12,53 R <sup>2</sup> = 0,129 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,00 Error = 10,0 IC <sub>50</sub> : >40	y=65,71-0,12x p = 0,1577 R <sup>2</sup> = 0,11 IC <sub>50</sub> : >40
Ciproconazol + azoxistrobina	y = 1,014ln(x) + 4,294 R <sup>2</sup> = 0,873 IC <sub>50</sub> : ns	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : NA	y=77,42-0,13x p = 0,0017 R <sup>2</sup> = 0,43 IC <sub>50</sub> : >40	y = -0,39ln(x) + 9,245 R <sup>2</sup> = 0,032 IC <sub>50</sub> : ns	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : NA	y=65,58-0,09x p = 0,4989 R <sup>2</sup> = 0,03 IC <sub>50</sub> : >40
Ciproconazol + picoxistrobina	y = 1,673ln(x) + 8,785 R <sup>2</sup> = 0,965 IC <sub>50</sub> : ns	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : 1,64	y=74,16-0,15x p = 0,0094 R <sup>2</sup> = 0,32 IC <sub>50</sub> : >40	y = 0,295ln(x) + 11,51 R <sup>2</sup> = 0,032 IC <sub>50</sub> : ns	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : >40	y=66,64-0,08x p = 0,3932 R <sup>2</sup> = 0,04 IC <sub>50</sub> : >40

Tabela 6 - Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) (1) do crescimento micelial de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* estimada por três métodos de regressão para fungicidas mituras comerciais com IQe. Passo Fundo – 2017

(Conclusão)

Fungicidas	Isolados					
	CT21			CT6		
	Métodos					
	Microsoft Excel	RStudio	Infostat	Microsoft Excel	RStudio	Infostat
Misturas comerciais com IQe						
Ciproconazol + trifloxistrobina	y = 1,898ln(x) + 9,336 R <sup>2</sup> = 0,880 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,9842 Error = 78,65 IC <sub>50</sub> : 1,56	y=73,06-0,26x p = 0,0032 R <sup>2</sup> = 0,39 IC <sub>50</sub> : >40	y = 0,624ln(x) + 5,244 R <sup>2</sup> = 0,162 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,9844 Error = 7,82 IC <sub>50</sub> : 0,15	y=72,76-0,20x p = 0,0049 R <sup>2</sup> = 0,36 IC <sub>50</sub> : >40
Epoxiconazol + piraclostrobina	y = 8,264ln(x) + 33,53 R <sup>2</sup> = 0,967 IC <sub>50</sub> : 7,3	p = 0,0895 Error = 1,7668 IC <sub>50</sub> : 3,09	y=64,25-1,00x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,58 IC <sub>50</sub> : 24,55	y = 6,76ln(x) + 24,56 R <sup>2</sup> = 0,911 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,0006 Error = 6,3861 IC <sub>50</sub> : 24,22	y=65,87-0,94x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,79 IC <sub>50</sub> : 27,84
Epoxiconazol + cresoxim-metilico	y = 7,127ln(x) + 25,19 R <sup>2</sup> = 0,921 IC <sub>50</sub> : 32,5	p = 0 Error = 3,4692 IC <sub>50</sub> : 18,44	y=71,05-1,04x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,80 IC <sub>50</sub> : 30,14	y = 2,984ln(x) + 25,07 R <sup>2</sup> = 0,792 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,6957 Error = 170,8327 IC <sub>50</sub> : >40	y=62,43-0,48x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,78 IC <sub>50</sub> : >40

Fonte: dados do autor.

Nota: NA (Não ajustado, significando que a curva não foi totalmente ajustada para determinar a dose). > 40: concentração estimada acima da dose mais alta. <0,01: concentração estimada abaixo da dose mais baixa.

(1) Em mg/L.



Tabela 7 - Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) (1) do crescimento micelial de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* estimada por três métodos de regressão para fungicidas misturas comerciais com ISDH. Passo Fundo – 2017

Fungicidas	Isolados					
	CT21			CT6		
	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat	Microsoft Excel	RStudio	InfoStat
	Misturas comerciais com ISDH					
Piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxada	y = 6,624ln(x) + 24,54 R <sup>2</sup> = 0,913 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,1331 Error = 9,8869 IC <sub>50</sub> : 15,21	y=66,34-0,77x p = 0,0003 R <sup>2</sup> = 0,52 IC <sub>50</sub> : 34,59	y = 4,261ln(x) + 23,00 R <sup>2</sup> = 0,856 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,08844 Error = 58,7050 IC <sub>50</sub> : >40	y=62,06-0,52x p = 0,0007 R <sup>2</sup> = 0,48 IC <sub>50</sub> : >40
Piraclostrobina + fluxapiroxada	y = 3,666ln(x) + 17,85 R <sup>2</sup> = 0,874 IC <sub>50</sub> : >40	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : 5,21	y=70,41-0,37x p = 0,0038 R <sup>2</sup> = 0,38 IC <sub>50</sub> : >40	y = 4,043ln(x) + 17,79 R <sup>2</sup> = 0,867 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,9396 Error = 21,9530 IC <sub>50</sub> : 1,68	y=67,11-0,28x p = 0,0069 R <sup>2</sup> = 0,34 IC <sub>50</sub> : >40
Azoxistrobina + benzovindiflupir	y = 9,582ln(x) + 61,64 R <sup>2</sup> = 0,808 IC <sub>50</sub> : 0,3	p = NA Error = NA IC <sub>50</sub> : 0,001340	y=38,18-0,62x p = 0,0265 R <sup>2</sup> = 0,24 IC <sub>50</sub> : <0,01	y = 8,801ln(x) + 58,65 R <sup>2</sup> = 0,826 IC <sub>50</sub> : 2,7	p = 0,2849 Error: 0,000389 1 IC <sub>50</sub> : 0,000326	y=38,82-0,72x p = 0,0228 R <sup>2</sup> = 0,26 IC <sub>50</sub> : <0,01
Trifloxistrobina + prothioconazol + bixafeno	y = 3,086ln(x) + 11,38 R <sup>2</sup> = 0,578 IC <sub>50</sub> : ns	p = 0,0012 Error = 23,874 IC <sub>50</sub> : >40	y=74,05-0,60x p = 0,00001 R <sup>2</sup> = 0,78 IC <sub>50</sub> : >40	y = 3,849ln(x) + 28,49 R <sup>2</sup> = 0,945 IC <sub>50</sub> : >40	p = 0,0846 Error = 82,613 IC <sub>50</sub> : >40	y = 61,99-0,51x p = 0,0001 R <sup>2</sup> = 0,59 IC <sub>50</sub> : >40

Fonte: dados do autor.

Nota: NA (Não ajustado, significando que a curva não foi totalmente ajustada para determinar a dose). > 40: concentração estimada acima da dose mais alta. <0,01: concentração estimada abaixo da dose mais baixa.

(1) Em mg/L.

## 5.5 Discussão

Poucas referências bibliográficas foram encontradas sobre a sensibilidade de *C. truncatum* isolado da soja em relação à determinação de  $CI_{50}$ . A utilização da  $CI_{50}$  para determinar a sensibilidade a fungicidas é amplamente utilizada em fitopatologia.

Investigações avaliaram a sensibilidade *in vitro* pelo crescimento micelial do fungo *Trichoconiella padwickii* (Ganguly) Jain, Kavaka para diferentes princípios ativos de fungicidas utilizados na cultura do arroz, por meio do cálculo da concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) determinado pelo programa InfoStat (ECHEVERRIA; GUTIÉRREZ; CARMONA, 2017).

Para a cultura da banana, isolados de *Colletotrichum* spp. foram submetidos ao teste *in vitro* contra três fungicidas (SALAZAR et al., 2012), e também em outro estudo verificando a sensibilidade de oito princípios ativos em relação ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* VAR. *anisopliae* (Metschn.) Sorokin (YÁÑEZ; FRANCE, 2010) e determinação de compostos fenólicos de *Prosopis nigra* (Griseb.) Hieron e *Prosopis alba* Griseb (PÉREZ et al., 2014), determinando a  $CI_{50}$  calculado por regressão através do InfoStat.

Outras áreas da ciência, além da agrônômica, utilizam o programa InfoStat para determinação de  $CI_{50}$ , como medicina (ARBE et al., 2017; CARRO et al., 2016; PASCUAL et al., 2014), plantas medicinais (TORRES-CARRO et al., 2017) e de alimentos e nutrição (MEZZA et al., 2018; OJEDA-SANA et al., 2013; YERENA et al., 2017).

Investigações reportaram que os dados de  $CI_{50}$  do crescimento micelial foram submetidos à análise de regressão logarítmica usando dois programas, InfoStat e Microsoft Excel (ROSSI; REIS; BRUSTOLIN, 2015), verificando a sensibilidade

de *Fusarium oxysporium* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder para dez fungicidas (ISHIZUKA, 2016 p. 11).

A utilização do Microsoft Excel para determinar a  $CI_{50}$  de fungicidas para as espécies *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) Jones & Grout, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* Bary (KORKMAZ et al., 2017) e utilizado também para verificação do potencial de controle de *Fusarium* spp. em exposição à *Trichoderma* sp., utilizado para o controle biológico (SCHÖNEBERG et al., 2015).

Para determinar a  $CI_{50}$  diversos programas, dentre eles o Microsoft Excel para determinação de sensibilidade ( $CI_{50}$ ) *in vitro* de métodos alternativos de complexos metálicos (MALINA et al., 2016), para determinação da  $CI_{50}$  em *Polygonum maritimum* L., utilizando o pacote estatístico XLSTAT (Microsoft Excel) (RODRIGUES et al., 2018) e para verificação de efeitos inibitórios (ZAHARUDIN; SALMEÁN; DRAGSTED, 2017), tanto em outras áreas de pesquisa agrônomicas (GIDDINGS; ARTS; HOMMEN, 2012) como também em áreas químicas (LI; CHIANG; HSU, 2010; ZHANG et al., 2012) e medicina (GONÇALVES et al., 2017; JEMAA et al., 2018).

O programa RStudio tem sido largamente no cálculo do efeito de dose-resposta em agronomia. Esse programa foi utilizado na quantificação da sensibilidade do fungo *Zymoseptoria* (sinônimo *Septoria*) *tritici* (Desm.) Quaedvl. & Crous (HAGERTY et al., 2017) e também para monitorar a sensibilidade de isolados de *Pyrenophora teres* (Died.) Drechsler (REHFUS et al., 2016). Em experimentos conduzidos para determinar a sensibilidade *in vivo* em *Puccinia triticina* Erikss aos fungicidas dos grupos químicos triazol e estrobilurina, a  $CI_{50}$  foi calculada através do pacote de dose-resposta do programa R (ARDUIM et al., 2012). Outros trabalhos também determinaram a  $CI_{50}$  com a utilização do mesmo programa para diversas linhas de pesquisas na área agrônômica como melhoramento de plantas (LOSERT et al., 2017) e em outras áreas científicas (COOMBS et al., 2017; GIUSTI et al., 2017; MALARA et al., 2017; M'RABET et al., 2017; SANTOS et al., 2016; TOUIHRI-BARAKATI et al., 2016; TOUIHRI-BARAKATI et al., 2017).

Resultados obtidos utilizando sete métodos para calcular a  $CI_{50}$ , do epoxiconazol para isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, indicaram maior precisão de três programas estatísticos (IBM Spss®, GraphPad Prism® e Dps®) e método de regressão log-linear. Assim, recomendaram para quantificar a sensibilidade de fungos a fungicidas a transformação logarítmica (LI et al., 2015; LIANG et al., 2015). Entretanto, a utilização dos dados na forma de modelos não lineares apresentam maiores complicações do que em uma avaliação linear (JIANG; KOPP-SCHNEIDER, 2014).

Os valores da  $CI_{50}$  não tem relação direta com a concentração, ou dose, usada no campo, porém é importante para comparar a potência entre fungicidas (mecanismos de ação e ingredientes ativos) e no monitoramento da sensibilidade de fungos (REIS; ZANATTA, CARMONA, MENTEN, 2015).

## 5.6 Conclusões

Os programas RStudio e Infostat são semelhantes para a determinação da  $CI_{50}$ , pois apresentam melhor ajuste dos dados de crescimento micelial. O Microsoft Excel não ajusta (ns) grande parte dos dados quando comparado aos outros dois métodos. Para os isolados que apresentam baixa sensibilidade (ou seja, maior  $CI_{50}$ ), a determinação feita com o programa RStudio demonstra melhor ajuste.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungicidas testados para verificação da sensibilidade apresentam alta variação na  $CI_{50}$  aos isolados do fungo *C. truncatum*. A sensibilidade do fungo varia de acordo com os diferentes mecanismos de ação dos fungicidas, sendo que a variabilidade entre a  $CI_{50}$  para os isolados indicam que sua origem influencia na sensibilidade do fungo. O controle do fungo em lavouras comerciais irá alterar-se de acordo com o ambiente e seleção direcional do fungo aos fungicidas.

Diferentes valores da  $CI_{50}$  são obtidos para os diferentes programas utilizada no seu cálculo. Os isolados que apresentam baixa sensibilidade, a determinação feita pelo programa RStudio demonstra melhor desempenho. Os programas Microsoft Excel e Infostat tendem a determinar maiores  $CI_{50}$  do que o RStudio. Dos três programas testados, dois, por apresentarem dados semelhantes, podem ser utilizados no cálculo da  $CI_{50}$ . Por outro lado, o Microsoft Excel não deve ser usado na determinação da sensibilidade de fungos a fungicidas.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

Confirma-se a hipótese de que a dificuldade de controle da antracnose pode ser atribuída à redução da sensibilidade do fungo a fungicidas. O fungo *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose da soja, apresenta variação da sensibilidade aos fungicidas testados. Ingredientes ativos, pertencentes ao mesmo mecanismo de ação apresentam fungitoxicidade distinta à *C. truncatum*.

A variabilidade da sensibilidade de *C. truncatum* ocorre de forma progressiva e temporal, em resposta a seleção direcional devida ao uso de fungicidas sítio-específicos, em pulverizações repetidas e numa grande área. No cálculo  $CI_{50}$ , com os dados do crescimento do fungo em resposta a fungicida e concentração, deve-se dar preferência ao programa RStudio.

## REFERÊNCIAS

- ADAMI, P. F.; SANTOS, I.; FRANCHIN, M. F.; SARTOR, L.; TARTARO, D.; NUNES, E.; XAVIER, F. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose (*Colletotrichum dematium* var. *truncata*) da soja (*Glycine max*). **Synergismus Scientifica UTFPR**, v. 1, p. 22-28, 2006.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microorganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em Fitopatologia**, Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 91–102.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agonômica Ceres, 1997. v. 2, 706 p.
- ALTAMIRANO, D. E.; ROJAS, H. V. S.; MIR, S. G. L.; MENDOZA, N. M.; ALVITER, A. R. Sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum acutatum* obtidos de morango nos fungicidas, tiofanato de metilo e azoxistrobina. **Revista Mexicana de Patologia Plantia**, v. 35, n. 2, p. 1-11, 2017.
- ARBE, M. F.; FONDELLO, C.; AGNETTI, L.; ÁLVAREZ, G. M.; TELLADO, M. N.; GLIKIN, G. C.; FINOCCHIARO, L. M. E.; VILLAVARDE, M. S. Inhibition of bioenergetic metabolism by the combination of metformin and 2-deoxyglucose highly decreases viability of feline mammary carcinoma cells. **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 461-468, 2017.
- ARDUIM, G. da S.; REIS, E. M.; BARCELLOS, A. L.; TURRA, C. *In vivo* sensitivity reduction of *Puccinia triticina* races, causal agent of wheat leaf rust, to DMI and QoI fungicides. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 306-311, 2012.

ARMSTRONG-CHO, C. L.; BANNIZA, S. *Glomerella truncata* sp. nov., the teleomorph of *Colletotrichum truncatum*. **Mycological Research**, v. 110, n. 8, p. 951-956, 2006.

BACKMAN, P. A.; WILLIAMS, J. C.; CRAWFORD, M. A. Yield losses in soybeans from anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 66, n. 11, p. 1032-1034, 1982.

BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBZANSKI B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.

BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, L. Manejo integrado de doenças. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 2011. v. 1, p. 409-419.

BESTOR, N. R. C.; ROBERTSON, A. E.; MUELLER, D. S. Effect of foliar fungicides on late-season anthracnose stem blight on soybean. **Plant Health Research**, v. 15, n. 3, p. 118-121, 2011.

BIJU, C. N.; RAVINDRAN, P.; PEERAN, M. F.; DARSHANA, C. N.; JASHMI, C. K.; JAVARAI AH, A. S. K. Significance of microsclerotia in the epidemiology of black pepper anthracnose and an approach for disease management in nurseries. **Journal of Phytopathology**, v. 165, 342-353, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 202 p.

CALZADA, C. T.; TUSSEL, R. T.; CIAPARA, I. H.; MEX, R. M.; GARCEZ, A. N.; BRITO, D. P. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistance isolates. **Plant Disease**, v. 99, n. 11, P. 1590-1595, 2015.

CALZADA, C. T.; TUSSELL, R. T.; CIAPARA, I. H.; POOT, E. H.; MEX, R. M.; GARCEZ, A. N.; BRITO, D. P. Characterization of *Colletotrichum truncatum* from papaya, pepper and physic nut based on phylogeny, morphology and pathogenicity. **Journal Plant Pathology**, 2017.



CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, n. 1, p. 181-213, 2012.

CARNIEL, L. A.; MENOSSO, R.; BALBINOT JUNIOR, A. A. Reação de cultivares de soja às doenças de final de ciclo com e sem aplicação de fungicidas. **Unoesc & Ciência**, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2014.

CARRO, R. T.; D'ALMEIDA, R. E.; ISLA, M. I.; ALBERTO, M. R. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Frankenia triandra* (J. Rémy) extracts. **South African Journal of Botany**, v. 104, p. 208-214, 2016.

CASTILLO, F.; HERNÁNDEZ, D.; GALLEGOS, G.; MENDEZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; REYES, A.; AGUILAR, C. N. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 324-328, 2010.

CHEN, Y.; JIN, L.; ZHO, M. Effect of azoxystrobin on oxygen consumption and cytb gene expression of *Colletotrichum capsici* from chilli fruits. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 5, p. 628-631, 2009.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, p. 414-420, 2013.

CHUNG, W. H.; ISHII, H.; NISHIMURA, K.; FUKAYA, M.; YANO, K.; KAJITANI, Y. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**, v. 90, n. 4, p. 506-512, 2006.

COOMBS, I. D.; MACLEAN, D. M.; JAYARAMAN, V.; FARRANT, M.; CULL-CANDY, S. G. Dual effects of TARP g-2 on glutamate efficacy can account for AMPA receptor auto inactivation. **Cell Reports**, v. 20, n. 5, p. 1123-1135, 2017.

COSTA, I. F. D.; BALARDIN, R. S.; MEDEIROS, L. A. M.; BAYER, T. M. Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1684-1688, 2006.

COSTA, I. F. D.; BALARDIN, R. S.; MEDEIROS, L. A. M.; LENS, G.; GULART, C. A.; ZEMOLIN, C. R.; SILVA, T. M. B. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum truncatum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 47-50, 2009.

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

DEAN, A.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DEAN, S. L.; TOBIAS, T. B.; PHIPPEN, W. B.; CLAYTON, A. W.; GRUVER, J.; PORRAS-ALFAROB, A. A study of *Glycine max* (soybean) fungal communities under different agricultural practices. **Plant Gene Journal**, v. 11, part A, p. 8-16, 2017.

DIAO, Y.; ZHANG, C.; XU, J.; LIN, D.; LIU, L.; MTUNG, O. G.; LIU, X. Genetic differentiation and recombination among geographic populations of the fungal pathogen *Colletotrichum truncatum* from chili peppers in China. **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 1, p. 108-118, 2015.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18-23, 2016.

ECHEVERRIA, A. D. L.; GUTIÉRREZ, S. A.; CARMONA, M. A. Sensibilidad *in vitro* de *Trichoconiella padwickii* a diversos principios activos usados como fungicidas en el cultivo del arroz. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 1, p. 70-74, 2017.

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

ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; MERCADER, J. V.; AGULLÓ, C.; ABAD-SOMOVILLA, A.; ABAD-FUENTES, A. Highly sensitive monoclonal antibody-based immunoassays for boscalid analysis in strawberries. **Food Chemistry**, 2017.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Fungicide resistance: definitions and use of terms. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, v. 18, n.4, p. 569-571, 1988.

FAO. Report of the first session of the F. A. O. **Panel of experts on integrated pest control**. F. A. O. Meeting Report. No. PL/1967/M/7. Rome: FAO, 1968.

FAN, Y.; MIAO, W.; LAI, K.; HUANG, W.; SONG, R.; LI, Q. X. Developmental toxicity and inhibition of the fungicide hymexazol to melanin biosynthesis in zebrafish embryos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. **Fungal Database, Systematic Botany and Mycological Laboratory**. ARS, USDA. (2007). Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>>. Acesso: 09 de novembro de 2017.

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

FERNANDES, E. G.; PEREIRA, O. L.; SILVA, C. C. da; BENTO, C. B. P.; QUEIROZ, M. V. de. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research Journal**, v. 181, p. 84-92, 2015.

FRAC. **FRAC Code List, 2016**: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). 2016. Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2016.pdf?sfvrsn=2>>. Acesso: 20 de outubro de 2017.

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

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis sojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2007.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GIDDINGS, J. M.; ARTS, G.; HOMMEN, U. The relative sensitivity of macrophyte and algal species to herbicides and fungicides: an analysis using species sensitivity

distributions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 9, n. 2, p. 308-318, 2012.

GIUSTI, F.; CAPRIOLI, G.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; SAGRATINI, G. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. **Food Chemistry**, v. 221, p. 689-697, 2017.

GONÇALVES, J. L. S.; BERNAL, C.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Hypericin cytotoxicity in tumor and non-tumor cell lines: A chemometric study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 86-90, 2017.

GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodoeiro com fungicidas no controle do tombamento em relação à densidade de inóculo de *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 360-366, 2006.

GREER, L. A.; HARPER, J. D. I.; SAVOCCHIA, S.; SAMUELIAN, S. K.; STEEL, C.C. Ripe rot of south-eastern Australian wine grapes is caused by two species of *Colletotrichum*: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* with differences in infection and fungicide sensitivity. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 17, n. 2, p. 123-128, 2011.

HAGERTY, C. H.; GRAEBNER, R. C.; SACKETT, K. E.; MUNDT, C. C. Variable competitive effects of fungicide resistance in field experiments with a plant pathogenic fungus. **Ecological Applications**, v. 27, n. 4, p. 1305-1316, 2017.

HE, M.; LI, D.; ZHU, W.; WU, E.; YANG, L.; WANG, Y.; WAHEED, A.; ZHAN, J. Slow and temperature-mediated pathogen adaptation to a nonspecific fungicide in agricultural ecosystem. **Evolutionary Applications**, v. 00, p. 1-11, 2017.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2009. (Embrapa Soja. Documentos, 256).

HU, M. J.; GRABKE, A.; DOWLING, M. E.; HOLSTEIN, H. J.; SCHNABEL, G. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. **Plant Disease**, v. 99, n. 6, p. 806-814, 2015.

ISHII, H.; ZHEN, F.; HU, M.; LI, X.; SCHNABEL, G. Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletotrichum* species. **Pest Management Science**, v. 72, n. 10, p. 1844-1853, 2016.

ISHIZUKA, M. S. **Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico de sementes de feijão para controle de *Fusarium oxysporium* f. sp. *phaseoli***. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

JAGTAP, G. P.; SONTAKKE, P. L. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum truncatum* isolates pathogenic to soybean. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 12, p. 1483-1487, 2009.

JAMADAR, M. M. Physiological studies on anthracnose of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] caused by *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus and Moore. **Global Institute For Research And Education**, v. 4, n. 1, p. 9-12, 2015.

JEMAA, M. B.; FALLEH, H.; SERAIRI, R.; NEVES, M. A.; SNOUSSI, M.; ISODA, H.; NAKAJIMA, M.; KSOURI, R. Nanoencapsulated *Thymus capitatus* essential oil as natural preservative. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 92-97, 2018.

JIANG, X.; KOPP-SCHNEIDER, A. Summarizing EC<sub>50</sub> estimates from multiple dose-response experiments: A comparison of a meta-analysis strategy to a mixed-effects model approach. **Biometrical Journal**, v. 56, n. 3, p. 493-512, 2014.

KATOCH, A.; PRABHAKAR, C. S.; SHARMA, P. N. Metageographic population analysis of *Colletotrichum truncatum* associated with chili fruit rot and other hosts using ITS region nucleotide sequences. **Journal Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 25, p. 64-72, 2016.

KORKMAZ, N.; AYDIN, A.; KARADAĞ, A.; YANAR, Y.; MAAŞOĞLU, Y.; ŞAHİN, E.; TEKİN, Ş. New bimetallic dicyanidoargentate (I)-based coordination compounds: Synthesis, characterization, biological activities and DNA-BSA binding affinities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 1007-1022, 2017.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J.A. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomical similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. **Plant Pathology**, v. 56, n. 3, p. 437-447, 2007.

LI, B. J.; CHIANG, C. C.; HSU, L. Y. QSAR Studies of 3,3 (Substituted-benzylidene)-bis-4-hydroxycoumarin, potential HIV-1 integrase inhibitor. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 57, n. 4, p. 742-749, 2010.

LI, J. L.; LIU, X. Y.; XIE, J. T.; DI, Y. L.; ZHU, F. X. A comparison of different estimation methods for fungicide EC<sub>50</sub> and EC<sub>95</sub> values. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 4, p. 239-244, 2015.

LIANG, H. J.; LI, J. L.; DI, Y. L.; ZHANG, A. S.; ZHU, F. X. Logarithmic transformation is essential for statistical analysis of fungicide EC<sub>50</sub> values. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 6, p. 456-464, 2015.

LOSERT, D.; MAURER, H. P.; MARULANDA, J. J.; WÜRSCHUM, T. Phenotypic and genotypic analyses of diversity and breeding progress in European triticale (3 Triticosecale Wittmack). **Plant Breeding**, v. 136, p. 18-27, 2017.

LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Chapter Two: The Evolution of Fungicide Resistance. **Advances in applied Microbiology**, v. 90, p. 29-92, 2015.

LYNCH, J. P.; GLYNN, E.; KILDEA, S.; SPINK, J. Yield and optimum fungicide dose rates for winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties with contrasting ratings for resistance to septoria tritici blotch. **Field Crops Research**, v. 204, p. 89-100, 2017.

M'RABET, Y.; ROKBENI, N.; CLUZET, S.; BOULILA, A.; RICHARD, T.; KRISA, S.; MARZOUKI, L.; CASABIANCA, H.; HOSNI, K. Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. leaves and fruits at two stages of maturity. **Industrial Crops & Products**, v. 107, p. 232-243, 2017.

MAHMUDI, F.; KADIR, J.; PUTEH, A. Genetic diversity and pathogenic variability of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of pepper in Malaysia. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 7, p. 456-465, 2014.

MALARA, D.; HOJ, L.; HEIMANN, K.; CITARRELLA, G.; OELGEMÖLLER, M. Capacity of cationic and anionic porphyrins to inactivate the potential aquaculture pathogen *Vibrio campbellii*. **Aquaculture**, v. 473, p. 228-236, 2017.

MALINA, L.; TOMANKOVA, K. B.; MALOHLAVA, J.; JIRAVOVA, J.; MANISOVA, B.; ZAPLETALOVA, J.; KOLAROVA, H. The *in vitro* cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy. **Toxicology in vitro**, v. 34, p. 246-256, 2016.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L. Anthracnose. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Eds.). **Compendium of Soybean Diseases**. 4. ed. Minnesota: Aps Press, 1999. p. 13-14.

MANANDHAR, J. B.; KUNWAR, I. K.; SINGH, T.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, v.75, n. 6, p. 704-708, 1985.

MENAT, J.; CABRAL, A. L.; PERUMAL, V.; WEI, Y.; BANNIZA, S. Mating system of *Glomerella truncata*: another *Glomerella* species with an atypical mating system. **Mycologia**, v. 104, n. 3, p. 641–649, 2012.

MEZZA, G. N.; BORGARELLO, A. V.; GROSSO, N. R.; FERNANDEZ, H.; PRAMPARO, M. C.; GAYOL, M. F. Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 242, p. 9-15, 2018.

MYCOBANK. *Colletotrichum truncatum*. 2017. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=6068&Fields=All>>. Acesso: 13 de novembro de 2017.

NAS (National Academy of Sciences). **Insect pest management and control**. Public. 1965. Washington: NAS, 1969.

OH, J. H.; KIM G. H. Influence of temperature, wetness duration and fungicides on fungal growth and disease progress of soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. **Korean Society of Plant Pathology**, v. 9, n. 3, p. 131-136, 2003.

OJEDA-SANA, A. M.; VAN BAREN, C. M.; ELECHOSA, M. A.; JUÁREZ, M. A.; MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 189-195, 2013.

OLIVEIRA, V. A.; MARTINS, L. P.; GONÇALVES, R. C.; BENÍCIO, L. P. F.; COSTA, D. L.; LUDWIG, J. Use of seed treatment with fungicide in control of *Colletotrichum truncatum* and physiological quality of soybean seeds *Glycine max*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 98-106, 2013.

PASCUAL, A. C.; GAVEGLIO, V. L.; GIUSTO, N. M.; PASQUARÉ, S. J. Cannabinoid receptor-dependent metabolism of 2-arachidonoylglycerol during aging. **Experimental Gerontology**, v. 55, p. 134-142, 2014.



PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; ROSA, M. C. M.; OLIVEIRA, G. E.; NETO, J. C. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2390-2395, 2009.

PEREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica, Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.

PERES, N. A. R.; SOUZA, N. L.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 125-130, 2004.

PÉREZ, M. J.; CUELLO, A. S.; ZAMPINI, I. C.; ORDOÑEZ, M. R.; ALBERTO, M. R.; QUISPE, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ISLA, M. I. Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacity. **Food Research Internacional**, v. 64, p. 762-771, 2014.

PESQUEIRA, A. S.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Fungicide association in the control of anthracnose in the soybean in Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 203-212, 2016.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. Controle químico da mancha angular e da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 92-94, 2000.

PRICKAERTS, J.; GOETHEM, N. P. V.; GULISANO, W.; ARGYROUSI, E. K.; PALMERI, A.; PUZZO, D. Physiological and pathological processes of synaptic plasticity and memory in drug discovery: Do not forget the dose-response curve. **European Journal of Pharmacology**, v. 817, p. 59-70, 2017.

PRUSKY, D.; ALKAN, N.; MENGISTE, T.; FLUHR, R. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 155-176, 2013.

Q-BANK. **List of included species**. 2017. Disponível em: <<http://www.q-bank.eu/Fungi/Biolomics.aspx?Table=All%20species%20ONLINE&genlist=t&T1474=Colletotrichum&fields=name&fields=E1501&fields=E1502>>. Acesso: 26 de outubro de 2017.



RAMDIAL, H.; ABREU, K.; RAMPERSAD, S. N. Fungicide sensitivity among isolates of *Colletotrichum truncatum* and *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex infecting bell pepper in Trinidad. **Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 118-124, 2017.

RAMDIAL, H.; HOSEIN, F. N.; RAMPERSAD, S. N. Detection and molecular characterization of benzimidazole resistance among *Colletotrichum truncatum* isolates infecting bell pepper in Trinidad. **Plant Disease**, v. 100, n. 6, p. 1142-1152, 2016.

RAMOS, A. M.; GALLY, M.; GARCÍA, M. C.; LEVIN, L. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 4, p. 186-190, 2010.

RAVA, C. A. Efficiency of fungicides to control anthracnose and angular leaf spot in common beans. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n.1, p. 65-69, 2002.

REHFUS, A.; MIESSNER, S.; ACHENBACH, J.; STROBEL, D.; BRYSON, R.; STAMMLER, G. Emergence of succinate dehydrogenase inhibitor resistance of *Pyrenophora teres* in Europe. **Pest Management Science**, v. 72, n. 10, p. 1977-1988, 2016.

REIS, E. M.; BARUFFI, D.; REMOR, L.; ZANATTA, M. Decomposition of corn and soybean residues under field conditions and their role as inoculum source. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 65-67, 2011.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; REIS, A. C. Antracnose. In: REIS, E. M.; CASA, R. T. (Eds.). **Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado**. 1. ed. Passo Fundo: Berthier, 2012. v. 1, p. 191-198.

REIS, E. M.; DEUNER, E.; ZANATTA, M. Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas triazóis e estrobilurina *in vivo*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 1, p. 21-24, 2015.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. 6 ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2010.

REIS, E. M.; ZANATTA, M.; CARMONA, M.; MENTEN, J. O. M. Relationship between IC<sub>50</sub> determined *in vitro/in vivo* and the fungicide rate used in the field. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 1, p. 49-53, 2015.

- REY, M. S.; LIMA, N. B.; SANTOS, J.; PIEROBOM, C. R.; BALARDIN, R. S. Inoculação de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) com *Colletotrichum lindemuthianum* usando diferentes níveis de restrição hídrica. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.14, n. 4-4, p. 112-116, 2008.
- RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W. **InfoStat versión 2013**. Córdoba: Grupo InfoStat, 2013.
- ROBERTI, R.; RIGHINI, H.; MASETTI, A.; MAINI, S. Compatibility of *Beauveria bassiana* with fungicides *in vitro* and on zucchini plants infested with *Trialeurodes vaporariorum*. **Biological Control**, v. 113, p. 39-44, 2017.
- RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. 2006. 291 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2006.
- RODRIGUES, M. J.; SLUSARCZYK, S.; PECIO, Ł.; MATKOWSKI, A.; SALMAS, R. E.; DURDAGI, S.; PEREIRA, C.; VARELA, J.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L. *In vitro* and *in silico* approaches to appraise *Polygonum maritimum* L. as a source of innovative products with anti-ageing potential. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 391-399, 2018.
- ROGÉRIO, F.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; BARBIERI, M. C. G.; BRAGANÇA, C. A. D.; SEIXAS, C. D. S.; ALMEIDA, A. M. R.; MASSOLA JR., N. S. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 402-415, 2016.
- ROSSI, R. L.; REIS, E. M.; BRUSTOLIN, R. Concentração de referência de fungicidas para a inibição miceliana de isolados de *Exserohilum turcicum* agente causal da hemintosporiose do milho. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 1, p. 25-30, 2015.
- RSTUDIO. **RStudio**. Boston: RStudio Inc., 2015.
- RUSSEL, P. E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management**. Cambridge: FRAC Monograph., 2004.
- SALAZAR, E.; HERNÁNDEZ, R.; TAPIA, A.; GÓMEZ-ALPÍZAR, L. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp.) de altura en la

zona de turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. **Agronomía Costarricense**, v. 36, n. 1, p. 53-68, 2012.

SAMUELIAN, S. K.; GREER, L. A.; SAVOCCHIA, S.; STEEL, C. C. Application of Cabrio (a.i. pyraclostrobin) at flowering and veraison reduces the severity of bitter rot (*Greeneria uvicola*) and ripe rot (*Colletotrichum acutatum*) of grape. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 20, n. 2, p. 292-298, 2014.

SANTANA, F. M.; CLEBSCH, C. C.; CARGNIN, A. **Crescimento micelial e germinação de esporos de patógenos de trigo em meios de cultura com fungicidas “in vitro”**. Embrapa Uva e Vinho, 2014.

SANT'ANNA, J. R.; MIYAMOTO, C. T.; ROSADA, L. J.; FRANCO, C. C. S.; KANESHIMA, E. N.; CASTRO-PRADO, M. A. A. Genetic relatedness of Brazilian *Colletotrichum truncatum* isolates assessed by vegetative compatibility groups and RAPD analysis. **Biological Research**, v. 43, n. 1, p. 51-62, 2010.

SANTOS, C. R.; CAVALCANTE, A. L. M.; HAUSER-DAVIS, R. A.; LOPES, R. M.; MATTOS, R. C. O. C. Effects of sub-lethal and chronic lead concentrations on blood and liver ALA-D activity and hematological parameters in Nile tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 250-256, 2016.

SCHÖNEBERG, A.; MUSA, T.; VOEGELE, R. T.; VOGELGSANG, S. The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* varies depending on the experimental approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1165-1179, 2015.

SHARMA, G.; PINNAKA, A. K. ; SHENOY, B. D. Infra-specific diversity of *Colletotrichum truncatum* associated with chilli anthracnose in India based on microsatellite marker analysis. **Journal Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, n. 20, p. 2509-2523, 2014.

SHARMA, R.; KAUSHAL, R. P. Characterization of pathogenic variability in *Colletotrichum truncatum* in Himachal Pradesh. **Indian Phytopathology**, v. 52, n. 4, p. 389-392, 1999.

SHAW, M. W.; EMMANUEL, C. J.; EMILDA, D.; TERHEM, R. B.; SHAFIA, A.; TSAMAIDI, D.; EMBLOW, M.; VAN, K.; JAN, A. L. Analysis of cryptic systemic *Botrytis* infections in symptomless hosts. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-14, 2016.

SILVA, D. D. de; CROUS, P. W.; ADES, P. K.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 155-168, 2017.

SILVA-JÚNIOR, G. J.; SPÓSITO, M. B.; MARIN, D. R.; AMORIM, L. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop. **Crop Protection**, v. 59, p. 51-56, 2014.

SINCLAIR, J. B.; SHURTLEFF, M. C. **Compendium of soybean diseases**. 3. ed. St. Paul: APS Press, 1975.

SIVARAJAN, S.; MAHARLOOEI, M.; BAJWA, S. G.; NOWATZKI, J. Impact of soil compaction due to wheel traffic on corn and soybean growth, development and yield. **Soil and Tillage Research**, v. 175, p. 234-243, 2018.

SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M. MATOS, K. S.; LIMA, G. S. A.; BESERRA JR., J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, p. 1-7, 2017.

SOUZA, R. T. **Reação de cultivares e controle da antracnose em soja**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

SPARK. SPARK SMART DECISIONS. **Foliar Fungides soybean season 16/17**. “Business Intelligence Panel”. 2017. Documento PPT.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; LEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 136-138.

THAN, P. P.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; PONGSUPASAMIT, S.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P. W. J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 562-572, 2008.

TOCHETTO, A.; GOMES, J. C.; GASPARI, A. J.; FILHO, C. B. Organismos e moléstias determinados. **Boletim Anual do Serviço de Fitopatologia**, v. 6, n. 11, 1961.

TORRES-CARRO, R.; ISLA, M. I.; THOMAS-VALDES, S.; JIMÉNEZ-ASPEE, F.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ALBERTO, M. R. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by medicinal plants from the Argentinean highlands (Puna). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 57-68, 2017.

TOUIHRI-BARAKATIA, I.; KALLECH-ZIRI, O.; AYADI, W.; KOVACIC, H.; HANCHI, B.; HOSNI, K.; LUIS, J. Cucurbitacin B purified from *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich from Tunisia inhibits  $\alpha 5\beta 1$  integrin-mediated adhesion, migration, proliferation of human glioblastoma cell line and angiogenesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 797, p. 153-161, 2017.

TOUIHRI-BARAKATI, I.; KALLECH-ZIRI, O.; BOULILA, A.; KHWALDIA, K.; MARRAKCHI, N.; HANCHI, B.; HOSNI, K.; LUIS, J. Targetting  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins with *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. seed oil. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1223-1232, 2016.

UPPALA, S.; ZHOU, X. G. Field efficacy of fungicides for management of sheath blight and narrow brown leaf spot of rice. **Crop Protection**, v. 104, p. 72-77, 2018.

VAN KAN, J. A. Licensed to kill: the life style of a necrotrophic plant pathogen. **Trends Plant Science**, v. 11, n. 5, p. 247-253, 2006.

VINCELLI, P.; DIXON, E. Resistance to QoI (strobilurin-like) fungicides in isolates of *Pyricularia grisea* from perennial ryegrass. **Plant Disease**, v. 86, p. 235-240, 2002.

VELHO, A. C.; ALANIZ, S.; CASANOVA, L.; MONDINO, P.; STADNIK, M. J. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology**, v. 119, n. 4, p. 229-244, 2015.

WEDGE, D. E.; SMITH, B. J.; QUEBEDEAUX, J. P.; CONSTANTIN, R. J. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. **Crop Protection**, v. 26, n. 9, p. 1449-1458, 2007.

WEEMS, J. D.; BRADLEY, C. A. Sensitivity of *Exserohilum turcicum* to demethylation inhibitor fungicides. **Crop Protection**, v. 99, p. 85-92, 2017.

WISE, K. A.; BRADLEY, C. A.; MARKELL, S.; PASCHE, J.; DELGADO, J. A.; GOSWAMI, R. S.; GUDMESTAD, N. C. Sensitivity of *Ascochyta rabiei* populations to prothioconazole and thiabendazole. **Crop Protection**, v. 30, n. 8, p. 1000-1005, 2011.

WISE, K. A.; BRADLEY, C. A.; PASCHE, J. S.; GUDMESTAD, N. C. Resistance to QoI fungicides in *Ascochyta rabiei* from Chickpea in the Northern great plains. **Plant Disease**, v. 93, n. 5, p. 528-536, 2009.

WONG, F. P.; MIDLAND, S. L. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. **Plant Disease**, v. 91, n. 12, p. 1547-1555, 2007.

YAÑEZ M.; FRANCE A. Effects of fungicides on the development of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 70, n. 3, p. 390-398, 2010.

YERENA, A. L.; RAMÍREZ, D. G.; RINCÓN, J. J.; SOLARES, T. E.; TREJO, B. R.; FAMIANI, F.; CASTILLO, J. G. C. Initial evaluation of fruit of accessions of *Persea schiedeana* Nees for nutritional value, quality and oil extraction. **Food Chemistry**, p. 1-6, 2017.

YOKOSAWA, S.; EGUCHI, N.; KONDO, K. I.; SATO, T. Phylogenetic relationship and fungicide sensitivity of members of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex from apple. **Journal of General Plant Pathology**, v. 83, n. 5, p. 291-298, 2017.

ZAHARUDIN, N.; SALMEÁN, A. A.; DRAGSTED, L. O. Inhibitory effects of edible seaweeds, polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. **Food Chemistry**, p. 1-8, 2017.

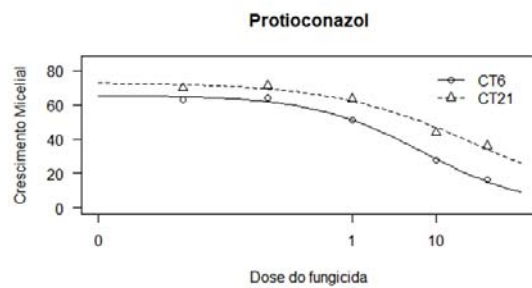
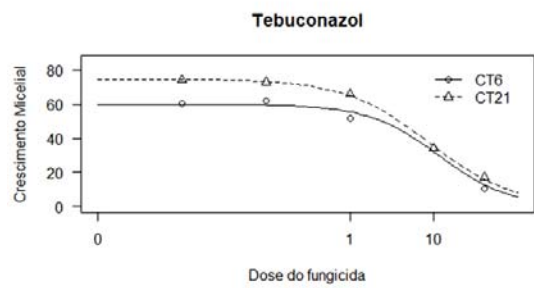
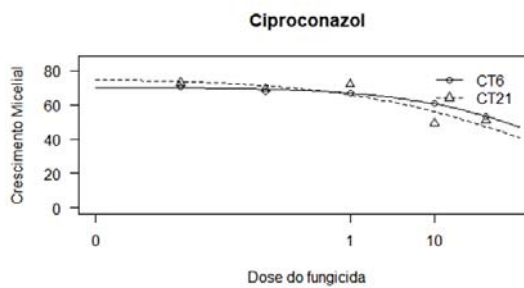
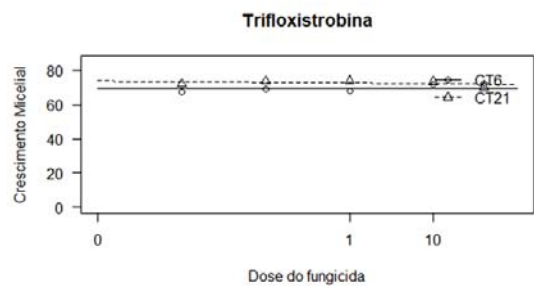
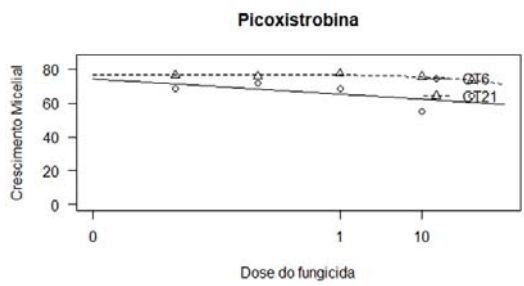
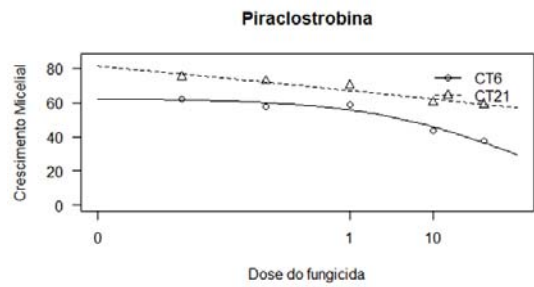
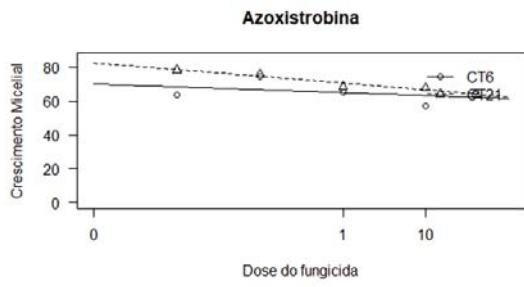
ZHANG, P.; DANG, Z.; SHEN, Z.; ZHU, W.; XU, X.; LIU, D.; ZHOU, Z. Enantioselective degradation of hexaconazole in rat hepatic microsomes *In vitro*. **Chirality**, v. 24, n. 4, p. 283-288, 2012.

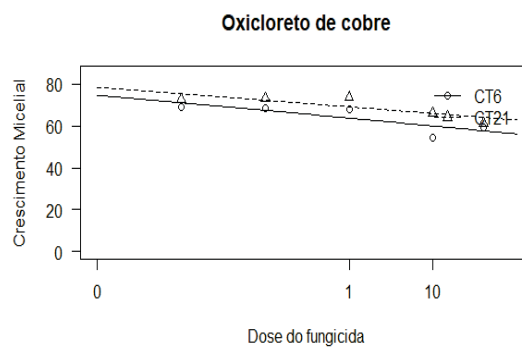
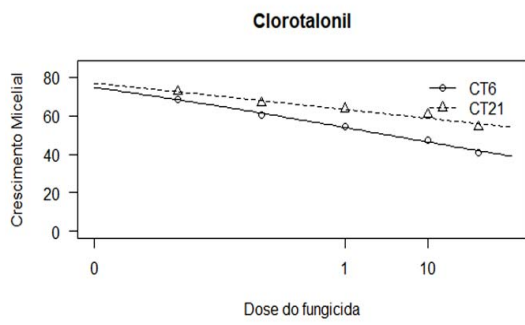
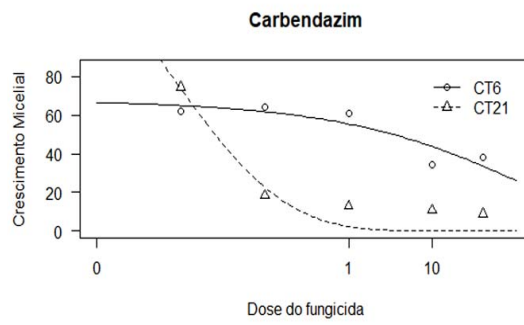
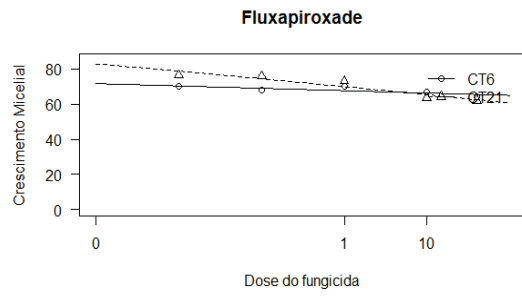
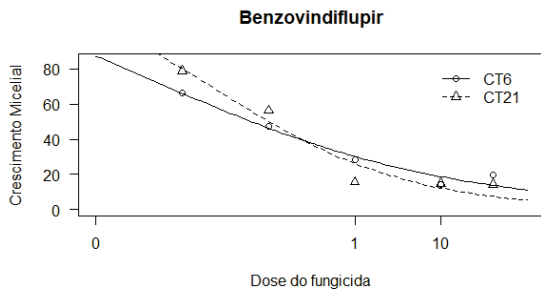
ZHANG, C.; DIAO, Y.; WANG, W.; HAO, J.; IMRAN, M.; DUAN, H.; LIU, X. Assessing the risk for resistance and elucidating the genetics of *Colletotrichum truncatum* that is only sensitive to some DMI fungicides. **Frontiers in Microbiology Journal**, v. 8, p. 1-11, 2017.

## APÊNDICES

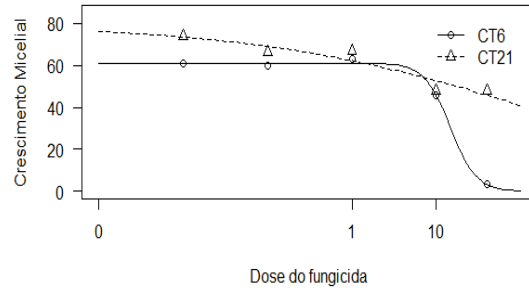
Apêndice I - Determinação a partir dos valores de  $CI_{50}$  de dois isolados de *Colletotrichum truncatum* para diferentes fungicidas. Passo Fundo – 2016



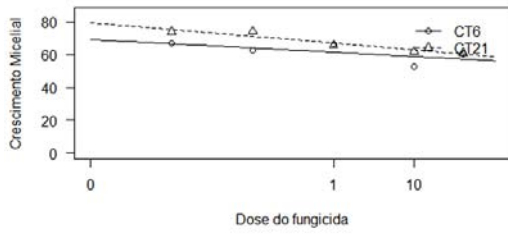




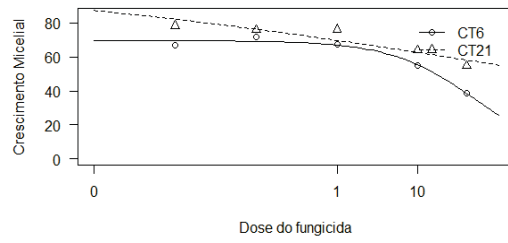
### Mancozebe



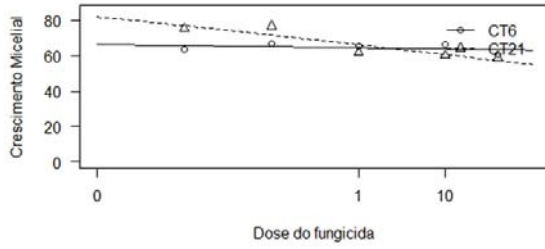
### Trifloxistrobina+Protioconazol



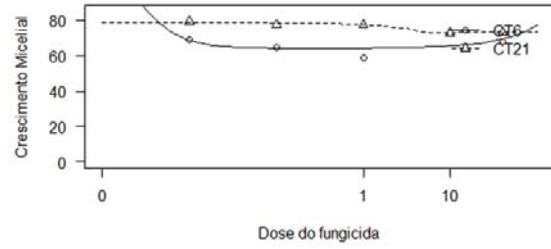
### Tebuconazol+Picoxistrobina



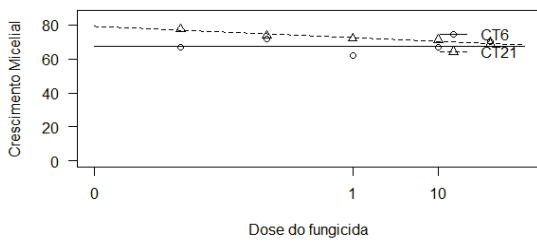
### Tebuconazol+Picoxistrobina +Mancozebe



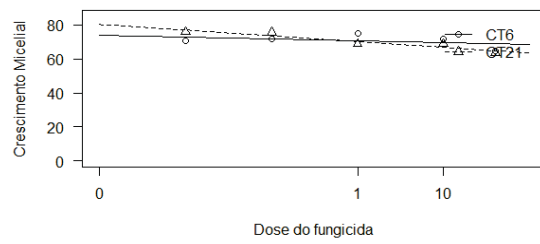
### Ciproconazol+Azoxistrobina

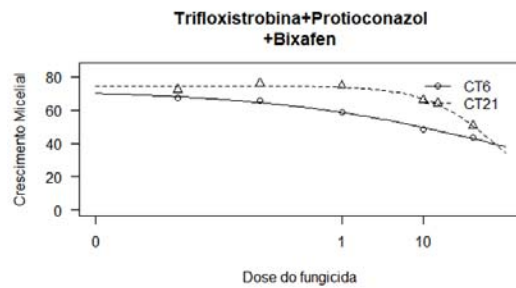
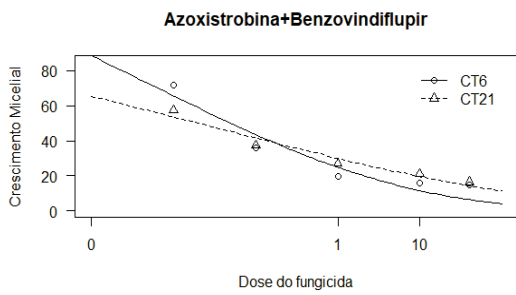
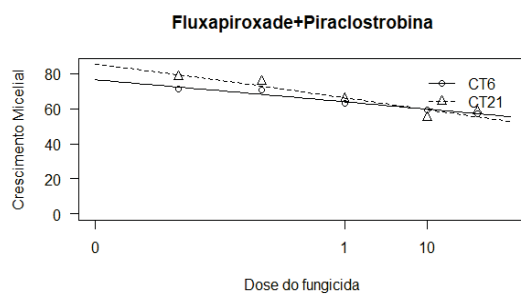
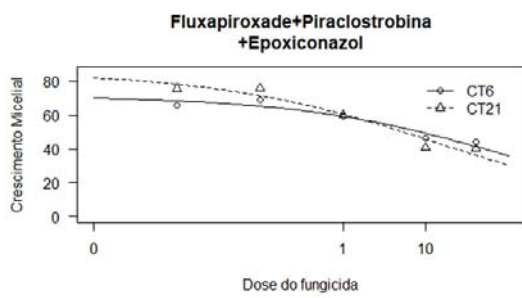
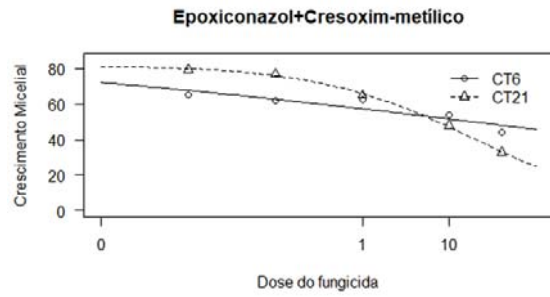
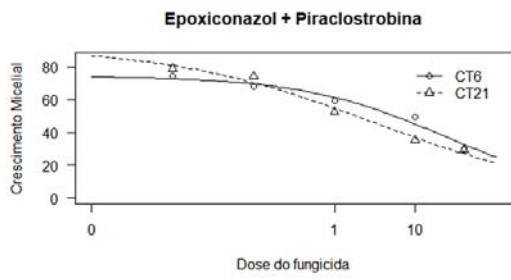


### Picoxistrobina+Ciproconazol



### Trifloxistrobina+Ciproconazol

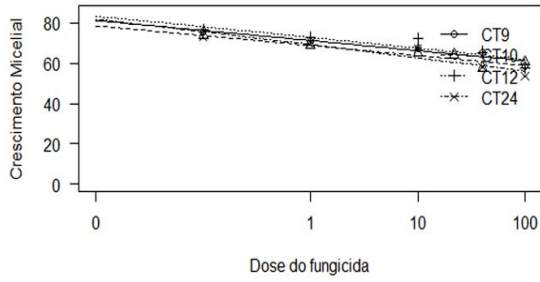




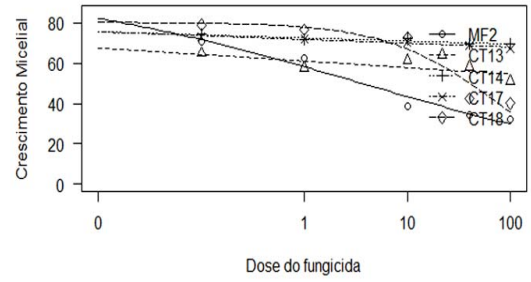
Nota: Gráficos das análises de regressão do programa RStudio, dos dados de concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) do Capítulo I. Crescimento micelial (mm) e dose do fungicida (mg/L).

Apêndice II - Determinação da  $CI_{50}$  para isolados de *Colletotrichum truncatum* provenientes de diferentes regiões produtoras de soja a diferentes fungicidas. Passo Fundo – 2017

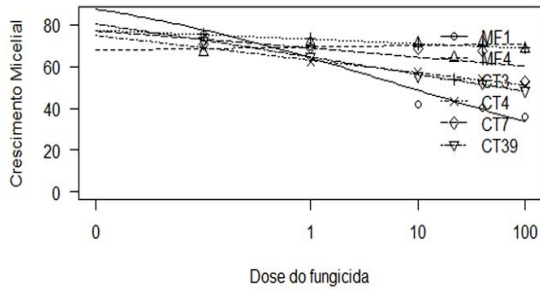
**Mancozebe (BA)**



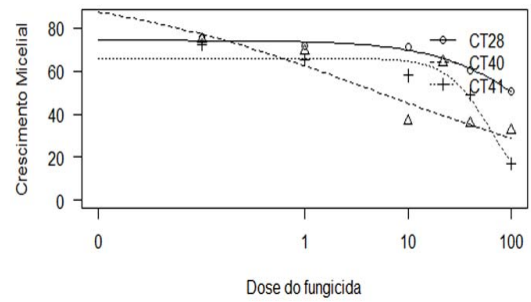
**Mancozebe (GO)**



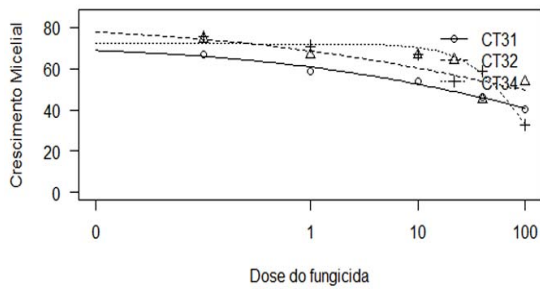
**Mancozebe (MT)**



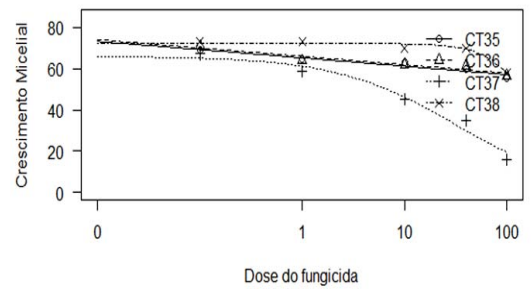
**Mancozebe (PR)**



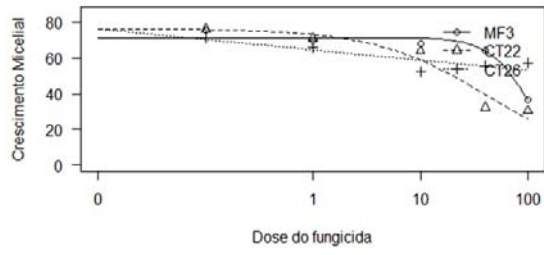
**Mancozebe (RS)**



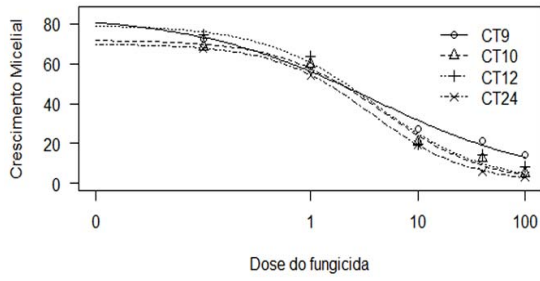
**Mancozebe (TO)**



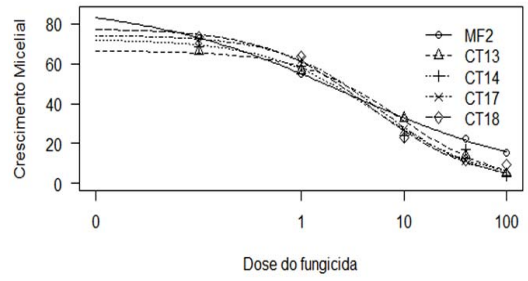
### Mancozebe



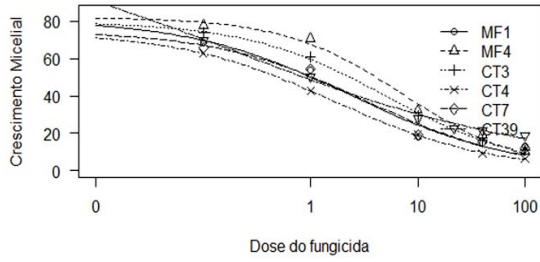
### Protioconazol (BA)



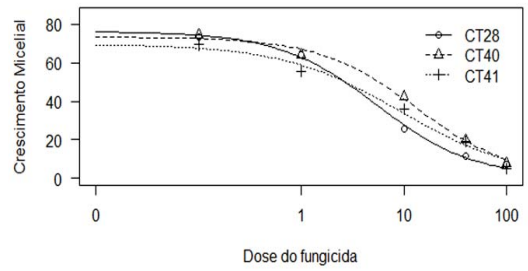
### Protioconazol (GO)

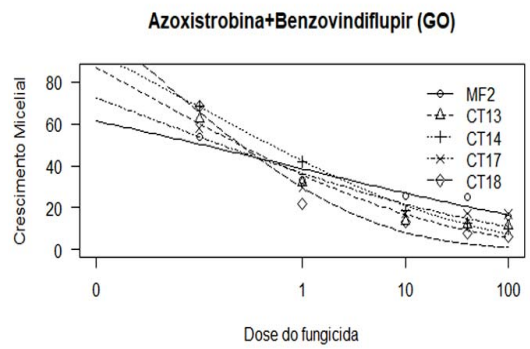
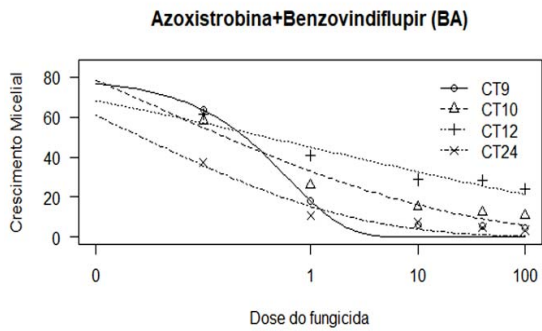
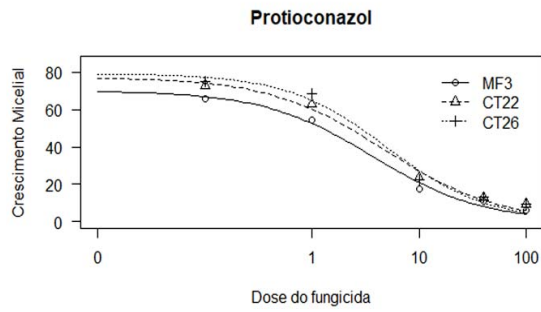
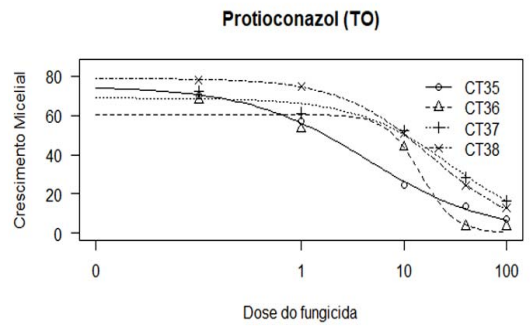
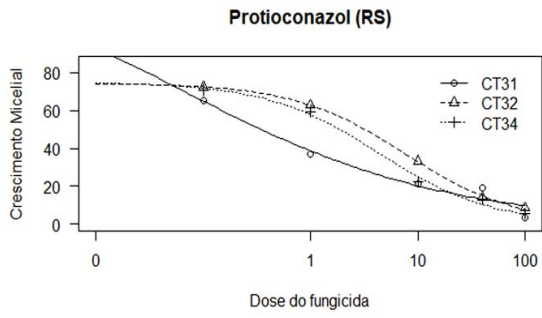


### Protioconazol (MT)



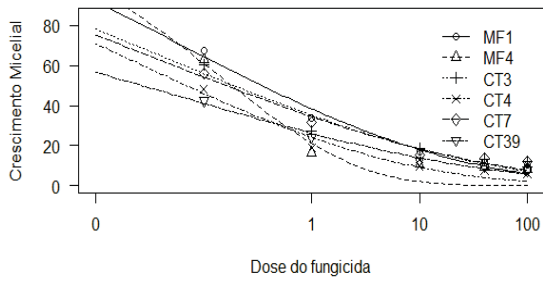
### Protioconazol (PR)



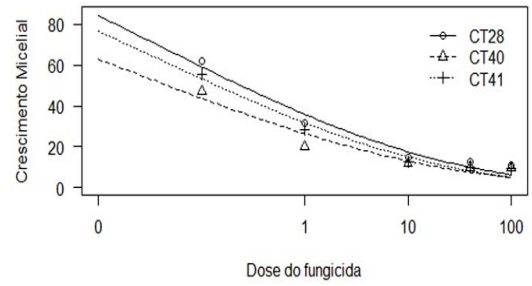




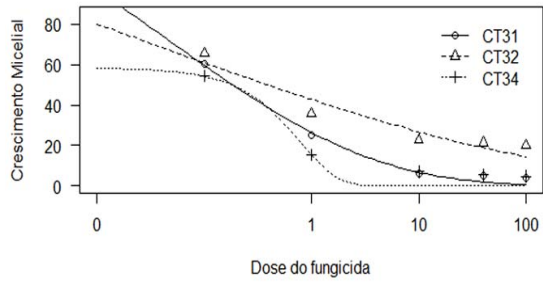
**Azoxistrobina+Benzovindiflupir (MT)**



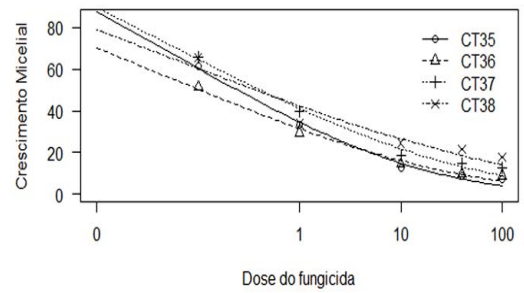
**Azoxistrobina+Benzovindiflupir (PR)**



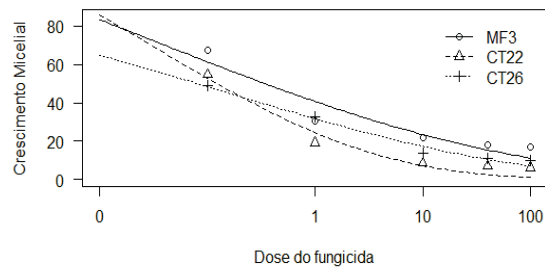
**Azoxistrobina+Benzovindiflupir (RS)**

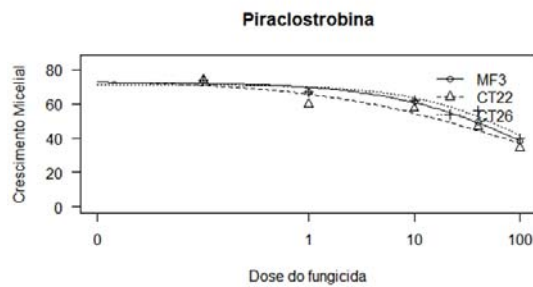
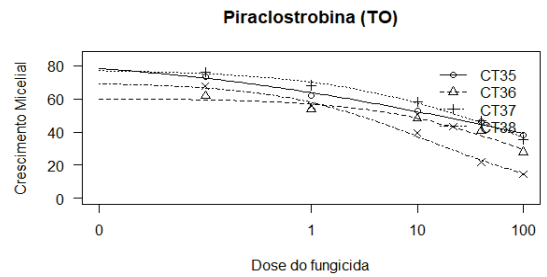
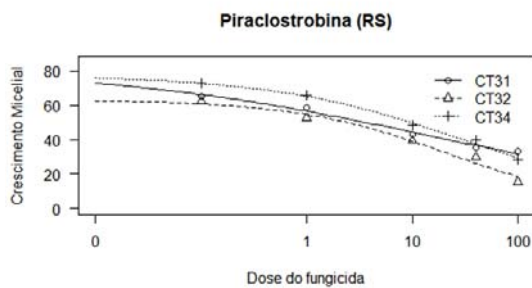
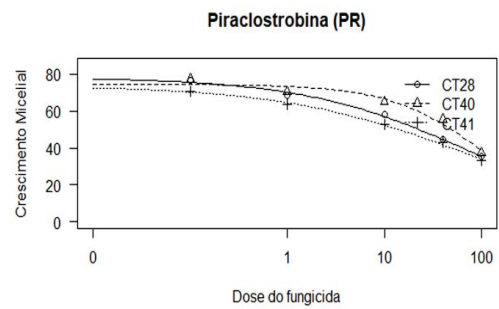
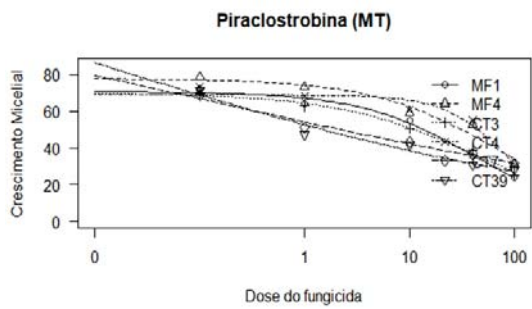
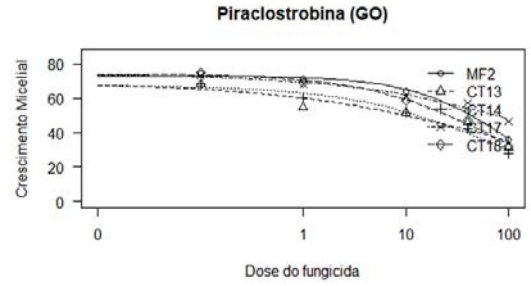
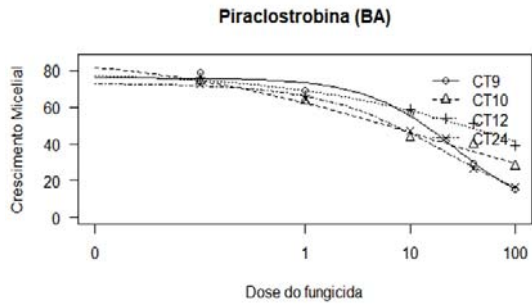


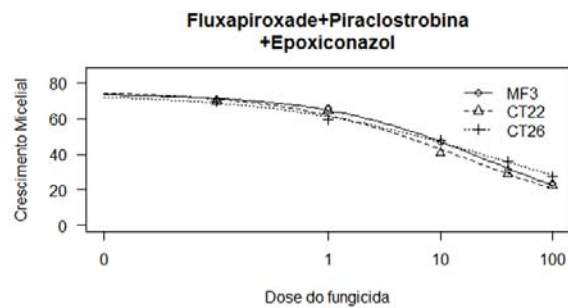
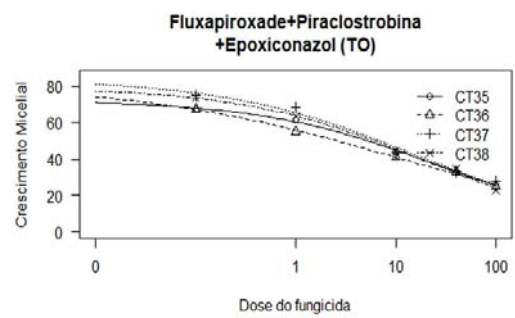
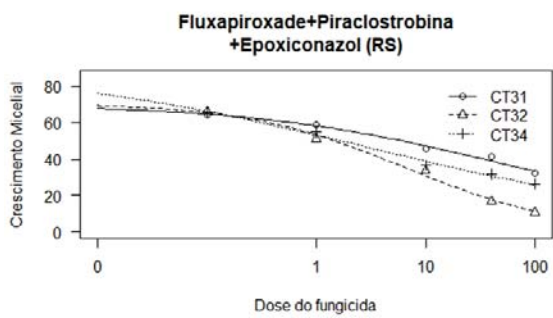
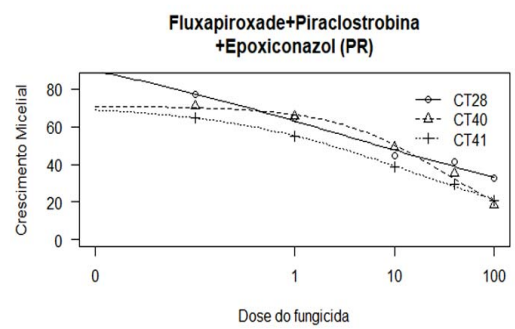
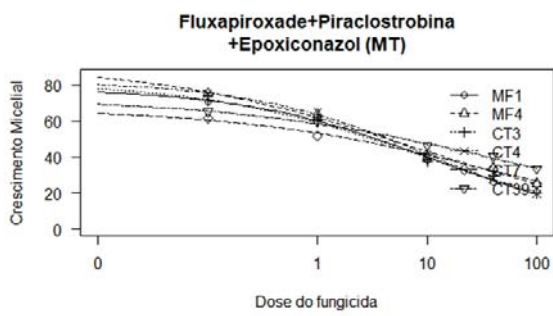
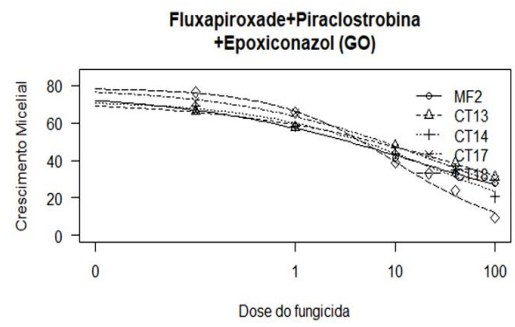
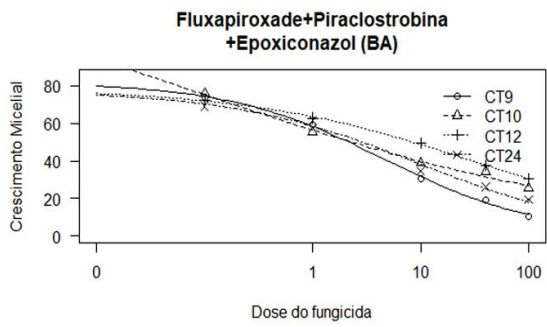
**Azoxistrobina+Benzovindiflupir (TO)**



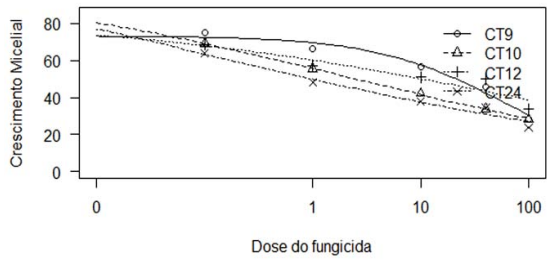
**Azoxistrobina+Benzovindiflupir**



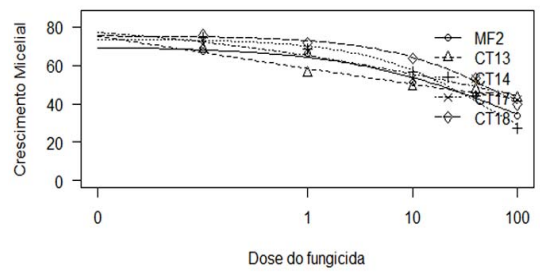




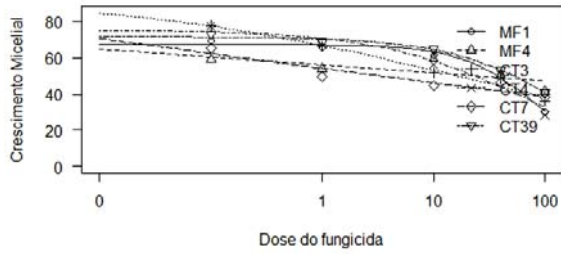
**Ciproconazol (BA)**



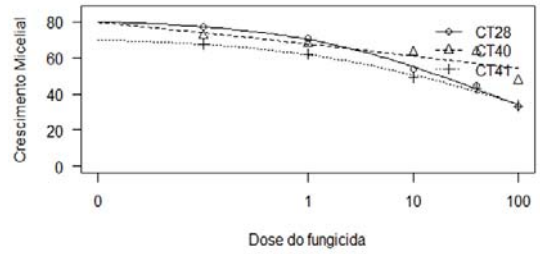
**Ciproconazol (GO)**



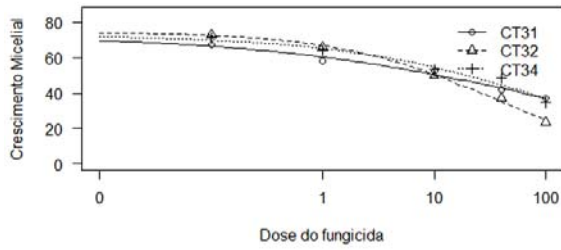
**Ciproconazol (MT)**



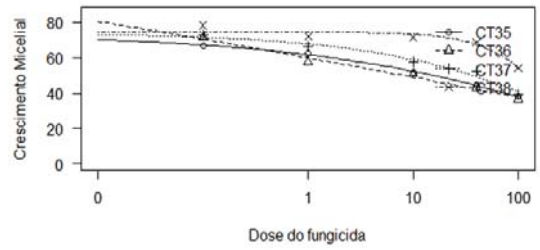
**Ciproconazol (PR)**

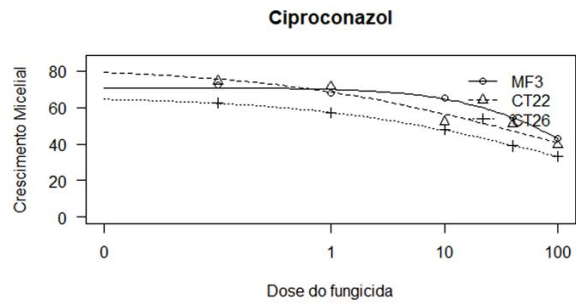


**Ciproconazol (RS)**



**Ciproconazol (TO)**





Nota: Gráficos obtidos das análises de regressão do programa RStudio, com os dados de concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) do Capítulo II. Crescimento micelial (mm) e dose do fungicida (mg/L).



## **PPGAgro**

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

**Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV**