

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

SENSIBILIDADE DE *Phakopsora pachyrhizi* A
FUNGICIDAS

MARTA MARIA CASA BLUM

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

Passo Fundo, julho de 2009

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

SENSIBILIDADE DE *Phakopsora pachyrhizi* A
FUNGICIDAS

MARTA MARIA CASA BLUM

Orientador: Prof. Dr. Erlei Melo Reis

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

Passo Fundo, julho de 2009

AGRADECIMENTOS

À meu pai Francisco que, junto com Deus, ampara a mim e minha família durante todos os momentos de nossas vidas.

À minha mãe Igenes, pelo amor, esforço e ajuda com meus filhos.

A meus filhos Isabel e Davi, pelo amor, alegria e compreensão.

A meu marido Rubens, por seu infinito amor.

A meus irmãos Ricardo e Ulisses, pelo apoio em todos os momentos.

À nossa família, meus amigos e querida Sabrina, pelo apoio e carinho.

Ao professor Erlei Melo Reis, por sua orientação, ensinamentos e dedicação e amizade.

Aos amigos e colegas Francieli T. Vieira e Eder N. Moreira por seu auxílio na condução dos trabalhos aqui desenvolvidos.

Ao professor Carlos A. Forcelini e à pesquisadora Amarilis L. Barcellos, pelo apoio e ensinamentos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UPF, pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores e colegas de trabalho, funcionários e alunos da URI de Erechim, pela oportunidade, apoio e amizade.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Ferrugem asiática da soja.....	9
2.2 Fungitoxicidade e sensibilidade.....	23
CAPÍTULO I Efeito de substrato, temperatura, tempo de exposição e fotoperíodo na germinação e no crescimento do tubo germinativo de uredosporos de <i>Phakopsora</i> <i>pachyrhizi in vitro</i>	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
1 INTRODUÇÃO.....	34
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Efeito de substratos sobre a germinação e sobre o comprimento dos tubos germinativos de uredosporos de <i>P.</i> <i>pachyrhizi</i>	37
2.2 Determinação da temperatura ótima para a germinação e para o crescimento dos tubos germinativos de uredosporos de <i>P. pachyrhizi</i>	38
2.3 Determinação do tempo de exposição para avaliação da germinação máxima e do crescimento máximo dos tubos germinativos de uredosporos de <i>P.</i> <i>pachyrhizi</i>	38
2.4 Efeito do fotoperíodo sobre a germinação e o crescimento dos tubos germinativos de uredosporos de <i>P.</i> <i>pachyrhizi</i>	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1 Efeito de substratos.....	40
3.2 Efeito da temperatura.....	44
3.3 Efeito do tempo de exposição.....	49
3.4 Efeito do fotoperíodo.....	54
4 CONCLUSÕES.....	59

CAPÍTULO II Sensibilidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> a fungicidas <i>in vitro</i>	61
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	62
1 INTRODUÇÃO.....	64
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4 CONCLUSÕES.....	80
CAPÍTULO III Sensibilidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> a fungicidas <i>in vivo</i>	82
RESUMO.....	82
ABSTRACT.....	83
1 INTRODUÇÃO.....	85
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	87
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
4 CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
APÊNDICES.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
CAPÍTULO I		
Tabela 1	Efeito de substratos sobre a germinação de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (6 h de exposição; escuro; 22 °C).....	41
Tabela 2	Efeito de substratos sobre o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (6 h de exposição; escuro; 22 °C).....	41
CAPÍTULO II		
Tabela 1	Concentração inibitória (mg L ⁻¹) de fungicidas estrobilurinas para reduzir em 50% a germinação dos uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , <i>in vitro</i> (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz).....	71
Tabela 2	Concentração inibitória (mg L ⁻¹) de fungicidas estrobilurinas para inibir em 50% o crescimento do tubo germinativo dos uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , <i>in vitro</i> (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz).....	72
Tabela 3	Concentração inibitória (mg L ⁻¹) de fungicidas triazóis para reduzir em 50% a germinação dos uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , <i>in vitro</i> (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência	

	de luz).....	73
Tabela 4	Concentração inibitória (mg L ⁻¹) de fungicidas triazóis para inibir em 50% o crescimento do tubo germinativo dos uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , <i>in vitro</i> (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz).....	74
CAPÍTULO III		
Tabela 1	Concentração inibitória (mg L ⁻¹) de fungicidas estrobilurinas para reduzir em 50% o número de lesões por cm ² de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , em folíolos de soja destacados.....	93
Tabela 2	Concentração inibitória (mg L ⁻¹) de fungicidas estrobilurinas para reduzir em 50% o número de pústulas por cm ² de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , em folíolos de soja destacados.....	94
Tabela 3	Concentração inibitória (mg L ⁻¹) de fungicidas triazóis para reduzir em 50% o número de lesões por cm ² de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , em folíolos de soja destacados.....	97
Tabela 4	Concentração inibitória (mg L ⁻¹) de fungicidas triazóis para reduzir em 50% o número de pústulas por cm ² de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , isolado sensível, em folíolos de soja destacados.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
CAPÍTULO I		
Figura 1	Relação entre a temperatura e a germinação de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (6 h exposição; escuro; ágar-água).....	47
Figura 2	Relação entre a temperatura e o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (6 h exposição; escuro; ágar-água).....	48
Figura 3	Relação entre o tempo de exposição e a germinação de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (1 h a 8 h; ágar-água; escuro; 22°C).....	50
Figura 4	Relação entre o tempo de exposição e o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (4 h a 40 h; ágar-água; escuro; 22 °C).....	51
Figura 5	Relação entre o tempo de exposição e o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (1 h a 8 h; ágar-água; escuro; 22 °C).....	52
Figura 6	Efeito do fotoperíodo sobre a germinação de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (ágar-água; 22 °C; E=escuro; L=luz; 4 regimes).....	57

Figura 7	Efeito do fotoperíodo sobre o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (ágar-água; 22 °C; E=escuro; L=luz; 4 regimes).....	57
Figura 8	Efeito do fotoperíodo sobre a germinação de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (ágar-água; 22 °C; E=escuro; L=luz; 12 regimes).....	58
Figura 9	Efeito do fotoperíodo sobre o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (ágar-água; 22 °C; E=escuro; L=luz; 12 regimes).....	58

SENSIBILIDADE DE *Phakopsora pachyrhizi* A FUNGICIDAS

MARTA MARIA CASA BLUM¹ E ERLEI MELO REIS²

RESUMO - Na maioria das regiões produtoras de soja do Brasil, a ferrugem asiática da soja representa uma ameaça, sob condições de clima favoráveis ao processo de infecção. Medidas de controle estão, basicamente, direcionadas para o controle químico, na parte aérea da cultura, e para o manejo de fontes de inóculo. Informações sobre a fungitoxicidade de substâncias químicas, para o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, seriam uma importante contribuição para a condução de trabalhos de pesquisa e monitoramento de sensibilidade. Objetivou-se com este trabalho avaliar a sensibilidade de *P. pachyrhizi* aos fungicidas azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol, metconazol, miclobutanil, tebuconazol e tetraconazol, *in vitro* e *in vivo*. Também, substrato, temperatura, tempo de exposição e fotoperíodo ideais para a germinação e o crescimento dos tubos germinativos, dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, *in vitro*, foram definidos. O substrato ágar-água destacou-se para os testes *in vitro*; as temperaturas ideais ficaram na faixa entre 20 e 25 °C; a máxima germinação dos uredosporos ocorreu com 6,4 h de tempo de exposição e na ausência de luz foram

¹Engenheira Agrônoma, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia - martablum@gmail.com

²Orientador, Eng. Agr., Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF - erleireis@tpo.com.br

observadas as máximas germinações e crescimentos dos tubos germinativos. A sensibilidade dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, *in vitro*, foi definida em função da inibição da germinação e da inibição do comprimento do tubo germinativo. Adotou-se a metodologia da adição de diferentes concentrações de fungicidas em meio ágar-água. A sensibilidade de *P. pachyrhizi*, *in vivo*, foi definida pela redução do número de lesões e do número de pústulas por unidade de área foliolar. Adotou-se a metodologia de folíolos de soja destacados, imersos em diferentes concentrações de fungicidas. As CI_{50} s (concentrações inibitórias) para *P. pachyrhizi*, *in vitro* e *in vivo*, foram determinadas. Para germinação dos uredosporos (*in vitro*) as CI_{50} s ficaram distribuídas nos seguintes intervalos de confiança: entre 0,01 e 0,16 mg L⁻¹ para azoxistrobina; 0,01 e 0,07 mg L⁻¹ picoxistrobina; 0,004 e 0,3 mg L⁻¹ piraclostrobina; 0,007 e 0,03 mg L⁻¹ trifloxistrobina; 1,64 e 4,48 mg L⁻¹ ciproconazol; 0,12 e 0,92 mg L⁻¹ epoxiconazol; 3,64 e 7,53 mg L⁻¹ flutriafol; 0,03 e 1,15 mg L⁻¹ metconazol; 1,65 e 4,02 mg L⁻¹ miclobutanil; 0,002 e 0,01 mg L⁻¹ tebuconazol e entre 2,65 e 17,63 mg L⁻¹ para tetraconazol. Para o número de lesões por cm² (*in vivo*), as CI_{50} s ficaram distribuídas nos intervalos de confiança entre 0,05 e 0,23 mg L⁻¹ para azoxistrobina; 0,02 e 0,26 mg L⁻¹ picoxistrobina; 0,05 e 0,41 mg L⁻¹ piraclostrobina; 0,05 e 0,22 mg L⁻¹ trifloxistrobina; 0,11 e 4,85 mg L⁻¹ ciproconazol; 0,002 e 2,38 mg L⁻¹ epoxiconazol; 8,06 e 26,28 mg L⁻¹ flutriafol; 1,15 e 3,10 mg L⁻¹ metconazol; 5,70 e 31,01 mg L⁻¹ miclobutanil; 0,12 e 1,44 mg L⁻¹ tebuconazol e entre 1,39 e 6,97 mg L⁻¹ para tetraconazol. Tanto *in vitro* como *in vivo*, os fungicidas do grupo das estrobilurinas apresentaram os menores valores de CI_{50} s. Uma maior amplitude de

valores de CI_{50} s, entre os fungicidas, foi constatada dentro do grupo dos triazóis, nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os valores de CI_{50} s, determinados neste trabalho, podem ser utilizados como fator de referência para condução de trabalhos futuros de monitoramento da sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas.

Palavras-chave: ferrugem asiática da soja, fungitoxicidade, estrobilurinas, triazóis, *Glycine max* (L.) Merr.

SENSITIVITY OF *Phakopsora pachyrhizi* TO FUNGICIDES

MARTA MARIA CASA BLUM AND ERLEI MELO REIS

ABSTRACT - In most of Brazilian soybean producer regions, the asian soybean rust represent a menace, under favorable climatic conditions for the infection process. Ways of disease control are basically focused on the chemical control and on the management of inoculum sources. Information about the fungitoxicity of chemical substances, to *Phakopsora pachyrhizi*, would be of great interest to conduct work on the fungicide sensitivity. The objective of this work was to evaluate the sensitivity of *P. pachyrhizi* to the fungicides azoxystrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, cyproconazol, epoxiconazol, flutriafol, metconazol, myclobutanil, tebuconazol and tetraconazol, *in vitro* and *in vivo*. Also, ideal

substrate, temperature, exposure time and photoperiod to *P. pachyrhizi*, *in vitro*, spore germination and uredospores germinative tube growth were defined. The agar-water substrate was notorious at the *in vitro* testings; the ideal temperatures ranged from 20 to 25°C; the maximum uredospores germination occurred with 6,4h of light exposure time and in the absence of light were observed the maximum germination and growth of the germinative tubes. The sensitivity of *P. pachyrhizi* uredospores, *in vitro*, was defined by the inhibition of germination and the inhibition of the germinative tube length. The addition of different concentrations of fungicides in agar-water methodology was used. The sensitivity of *P. pachyrhizi*, *in vivo*, was defined by the reduction in the number of lesions and the number of pustules per unit of leaf area. The detached soybean leaf methodology was used. Leaflets were immersed in different concentration of fungicides. The IC₅₀s (Inhibitory Concentrations) to *P. pachyrhizi*, *in vitro* and *in vivo*, were determined. For the germination of the uredospores (*in vitro*) the IC₅₀s were found at the following confidence intervals: between 0,01 e 0,16 mg L⁻¹ for azoxystrobin; 0,01 and 0,07 mg L⁻¹ picoxystrobin; 0,004 and 0,3 mg L⁻¹ pyraclostrobin; 0,007 and 0,03 mg L⁻¹ trifloxystrobin; 1,64 and 4,48 mg L⁻¹ cyproconazol; 0,12 and 0,92 mg L⁻¹ epoxiconazol; 3,64 and 7,53 mg L⁻¹ flutriafol; 0,03 and 1,15 mg L⁻¹ metconazol; 1,65 and 4,02 mg L⁻¹ myclobutanil; 0,002 and 0,01 mg L⁻¹ tebuconazol and between 2,65 and 17,63 mg L⁻¹ for tetraconazol. For the number of lesions per cm² (*in vivo*), the IC₅₀s were found distributed on the confidence intervals between 0,05 and 0,23 mg L⁻¹ for azoxystrobin; 0,02 and 0,26 mg L⁻¹ picoxystrobin; 0,05 and 0,41 mg L⁻¹ pyraclostrobin; 0,05 and 0,22 mg L⁻¹

tryfloxistrobin; 0,11 and 4,85 mg L⁻¹ cyproconazol; 0,002 and 2,38 mg L⁻¹ epoxiconazol; 8,06 and 26,28 mg L⁻¹ flutriafol; 1,15 and 3,10 mg L⁻¹ metconazol; 5,70 and 31,01 mg L⁻¹ myclobutanil; 0,12 and 1,44 mg L⁻¹ tebuconazol and between 1,39 and 6,97 mg L⁻¹ for tetraconazol. In both *in vitro* and *in vivo*, the group of fungicides strobilurins got the lower values of IC₅₀. One of the greatest values amplitude in the IC₅₀s, between the fungicides, was observed on the triazoles group in the *in vitro* and *in vivo* experiments. The IC₅₀s values, determined in this work, may be used as reference data for future work of monitoring the sensitivity of *P. pachyrhizi* to fungicides.

Key-words: asian soybean rust, fungitoxicity, strobilurins, triazoles, *Glycine max* (L.) Merr.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, segundo maior produtor mundial de grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (27% da produção), semeou na safra de 2007/08 o equivalente a 21,3 milhões de ha, obtendo uma produção aproximada de 60 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2009). Os índices de produtividade das lavouras de soja brasileiras destacam-se perante outros países que cultivam este grão. A tecnologia coloca o Brasil em condição vantajosa para disputa do mercado internacional, que demanda quantidades crescentes do grão (CHRISTENSEN & BINDÉ, 2004).

Por outro lado, o potencial de rendimento de grãos de soja tem sido limitado em função de muitos fatores. Entre eles, destacam-se, as condições de clima no decorrer do ciclo da cultura, os sistemas de rotação e sucessão de culturas, o manejo e a fertilidade do solo, a escolha de cultivares, a qualidade das sementes, o manejo de plantas daninhas, de insetos-pragas e de doenças, o sistema de implantação da lavoura e a tecnologia de colheita (REUNIÃO, 2008; TECNOLOGIAS, 2009).

Sem dúvida, ao lado da expansão da cultura, grande potencial de danos e perdas está relacionado ao complexo de doenças a ela relatado. Destacam-se aquelas relacionadas à germinação de sementes, podridões radiculares, doenças em hastes e vagens e doenças foliares. Esses danos e perdas dependem, fundamentalmente, da frequência de ocorrência das doenças e suas intensidades,

governadas por condições climáticas predominantes na região de cultivo e pelas práticas culturais adotadas pelo agricultor (CASA & REIS, 2004).

Na safra de 2001/02 a ferrugem asiática da soja (sob denominação comum de “ferrugem da soja”), doença foliar causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd. foi constatada no Brasil (YORINORI, 2002) e, atualmente, na maioria das regiões produtoras de soja, representa ameaça para a cultura em função dos danos e perdas causados. O problema se deve, principalmente, à indisponibilidade, até o momento, de cultivares resistentes, ao pouco conhecimento da epidemiologia da doença, às deficiências de tecnologias de pulverização e à logística para aplicação de fungicidas nas lavouras, trazendo como consequência, aumento dos custos de produção para seu controle (YORINORI et al., 2004; REIS et al., 2006).

As medidas de controle para a ferrugem da soja estão, basicamente, direcionadas para o controle químico na parte aérea da cultura e para o manejo de fontes de inóculo, fora da estação de cultivo da soja. Também se sugere o uso de cultivares de ciclo precoce e semeadura no início da época recomendada (YORINORI et al., 2004; REIS et al., 2006; REUNIÃO, 2008; TECNOLOGIAS 2008).

Com relação às medidas de controle, tendo como objetivo o controle químico da ferrugem da soja, inúmeros trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos de maneira a comprovar, principalmente em condições de campo, a eficácia de diferentes princípios ativos de fungicidas, momentos de aplicação (em relação ao

ciclo de desenvolvimento da cultura), tecnologias de aplicação e efeito residual.

Por outro lado, dentro do patossistema *P. pachyrhizi* x soja, no que se referem a metodologias para o desenvolvimento de pesquisas em condições de laboratório ou ambiente controlado, muitas informações necessitam ser geradas ou mesmo ajustadas.

Uma importante contribuição, neste sentido, refere-se a informações sobre a fungitoxicidade (toxicidade a fungos em baixas concentrações) de substâncias químicas sobre o fungo *P. pachyrhizi*.

Parâmetros como a DE₅₀ (dose efetiva ou eficaz que promove um efeito desejado em 50% dos microrganismos submetidos ao teste) ou CI₅₀ (concentração inibitória) definem a fungitoxicidade de uma substância química (SHARVELLE 1961; EDGINGTON et. al., 1971; LOOMIS, 1995; SILVA, 2006).

Valores de CI₅₀ (concentração inibitória), para diferentes fungicidas e específicos a *P. pachyrhizi* são escassos na literatura, contudo muito úteis na condução de trabalhos de pesquisa e monitoramento de sensibilidade, principalmente em regiões onde a demanda pelo uso de fungicidas na cultura é intensa.

Com o objetivo de definir uma metodologia para condução de testes com *P. pachyrhizi in vitro* e, através dela, gerar valores de CI₅₀ para diferentes fungicidas registrados para o controle da ferrugem da soja no Brasil, experimentos foram conduzidos no período de 2005 a 2008, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo - RS, visando determinar a sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ferrugem asiática da soja

A cultura da soja é atacada por duas espécies do fungo pertencente ao gênero *Phakopsora*, sob a denominação comum de ferrugem da soja: uma descrita como ferrugem asiática ou ferrugem australasiana, causada por *P. pachyrhizi* (forma anamórfica *Malupa sojae*), e a outra como ferrugem sul-americana ou ferrugem americana, causada por *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur (forma anamórfica *Malupa vignae*), considerando-se o local de descrição das espécies do fungo agente causal. Há relato, na África, de uma terceira espécie de ferrugem na soja, mas o nome para esta espécie ainda não está corretamente descrito (YORINORI et al., 2004; SINCLAIR & HARTMAN, 1995).

Ambas as espécies possuem urédias e uredosporos semelhantes, distinguindo-se morfológicamente nas características de télias e teleutosporos (CARVALHO JÚNIOR & FIGUEIREDO, 2000) e, geneticamente, pelas regiões ITS 1 e 4, utilizando *primers* específicos (FREDERICK et al., 2002). A formação de teleutosporos é rara na maioria dos hospedeiros, em regiões tropicais, por não ocorrer condições ambientais favoráveis, como umidade e temperatura (YEH et al., 1981).

Para a ferrugem americana (*P. meibomiae*), praticamente, não há relatos de danos e perdas. Uma epidemia foi registrada no Brasil na safra de 1987/88, na região de São Gotardo, em Minas Gerais, estando sua ocorrência condicionada a regiões com

temperaturas mais amenas (média abaixo de 25°C) e com umidade relativa do ar elevada, coincidindo com regiões como do cerrado brasileiro (altitudes superiores a 800 m) e na região sul (YORINORI, 1989).

Na safra 2002/03, Piuga et al. (2004) realizaram levantamento em diferentes regiões do Brasil, constatando a presença simultânea das duas espécies de ferrugem (*P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*) em amostras oriundas das regiões de Passo Fundo (RS) e Ponta Grossa (PR).

Sousa et al. (2007), na safra 2003/04, em levantamento sobre a ocorrência das duas espécies de *Phakopsora* no estado de Minas Gerais, utilizando técnicas moleculares, avaliaram 86 amostras de folhas de soja, provenientes de 22 municípios, onde confirmaram que a espécie presente em 100% das amostras analisadas foi *P. pachyrhizi*.

A importância da ferrugem asiática pode ser avaliada pela sua rápida expansão nas regiões produtoras de soja no Brasil, por seus danos e pelo montante de perdas que tem provocado (YORINORI et al., 2004; REIS et al., 2006).

2.1.1 Histórico e distribuição geográfica

O primeiro relato da ferrugem asiática foi no Japão em 1902. A forma asiática, causada pelo fungo *P. pachyrhizi*, foi descrita como patógeno em uma leguminosa chamada *Pachyrhizus erosus* (L.) urb. (Sydow e Sydow, 1914, apud KOCH et al., 1983). Por volta de 1934 surgiu em caráter epidêmico em vários países no sudoeste da

Ásia. Na Austrália foi observada desde 1934, contudo com perdas relatadas a partir de 1970/71 (BROMFIELD, 1984; YANG, 1977). Na Tailândia e Taiwan é relatada como a doença de maior importância econômica na cultura da soja (BROMFIELD, 1984). Em 1994 foi detectada, pela primeira vez fora da Ásia e Austrália, no Hawaii (KILLGORE & HEU, 1994). Na África a primeira constatação foi em Uganda em 1996 (KAWUKI et al., 2003). Em 1998 foi detectada em Zimbábwe e Zâmbia (LEVY, 2004); em 2001 na África do Sul (PRETORIUS et al., 2001).

No continente americano foi descrita, pela primeira vez, no Paraguai na safra de 2001 (MOREL PAIVA, 2001) e após no Brasil, também, em 2001 (YORINORI, 2002); no Rio Grande do Sul, na safra de 2002 (REIS et al., 2002), na Argentina na safra 2001/2 e na Bolívia na safra 2002/03. Em 2004 foi constatada no Uruguai (STEWART et al., 2005), na Colômbia (YORINORI et al., 2004) e nos Estados Unidos (SCHNEIDER et al., 2005; ROGERS & REDDING, 2009) e em 2005 no México (BAEZA, 2006).

Com a confirmação da ocorrência da ferrugem asiática da soja no continente americano a partir do ano de 2001, Yorinori et al. (2004) sugerem considerar toda referência a essa doença nas Américas, anterior a este ano, como sendo causada por *P. meibomiae*.

Até o ano de 2004, a ferrugem asiática da soja já havia sido detectada em todas as regiões produtoras de soja do Brasil, ao sul do equador (YORINORI et al., 2004). Na presente data, entre as regiões que cultivam soja no Brasil, a ferrugem da soja ainda não foi constatada no estado de Roraima (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2009).

2.1.2 Biologia

2.1.2.1 Taxonomia do agente causal

O fungo que causa a ferrugem asiática da soja pertence à classe Basidiomicetes, ordem Uredinales, Família Phakopsoraceae, gênero *Phakopsora* e espécie *pachyrhizi* (SINCLAIR & HARTMAN, 1999). Bauer et al. (2008) propõe para “classe” o enquadramento em Urediniomicetes.

Alguns sinônimos para *P. pachyrhizi* são: *Malupa sojae*, *Malupa vignae*, *Phakopsora sojae*, *Phakopsora vignae*, *Physopella pachyrhizi*, *Uredo sojae*, *Uredo vignae* e *Uromyces sojae* (SINCLAIR & HARTMAN, 1999).

2.1.2.2 Ciclo de vida

De acordo com Alexopoulos et. al. (1996) um fungo do grupo das ferrugens pode produzir cinco diferentes estágios em seu ciclo de vida: estágio 0 (espermogônios produtores de espermácias e hifas receptivas), estágio I (aécia produzindo aeciosporos), estágio II (urédia produzindo uredosporos), estágio III (télia produzindo teliosporos) e estágio IV (basídias produzindo basidiosporos).

P. pachyrhizi tem sido descrito em seus estágios de urédia e telia. A produção dos demais estágios não se encontra relatada, assim como, a função da fase de telia não está totalmente esclarecida (MARCHETTI et al., 1975; YEH et al., 1981).

O agente causal da ferrugem asiática da soja, a semelhança das demais ferrugens, é um parasita biotrófico que depende nutricionalmente dos tecidos vivos do seu hospedeiro para parasitar e sobreviver. *P. pachyrhizi* não apresenta fase saprofítica, embora produza teliosporos. As principais fontes de inóculo do patógeno são as plantas vivas de soja infectadas, plantas voluntárias ou cultivadas no período de entressafra e os hospedeiros secundários (YORINORI et al., 2004; REIS et al., 2006).

O principal tipo de inóculo da ferrugem asiática da soja são os uredosporos. Esses esporos são pequenos e leves, sendo removidos das urédias presentes nas folhas, quando estas se encontram com a superfície seca. São facilmente disseminados para lavouras próximas ou a longas distâncias pelo vento. Uma vez depositados sobre a superfície foliar do hospedeiro, permanecem em repouso a espera dos estímulos que conduzem ao processo de infecção (YORINORI et al., 2004; REIS et al., 2006).

Na presença de água livre e de temperatura favorável, inicia o processo de germinação. A maioria dos uredosporos emite um tubo germinativo, formando apressório. Zambenedetti et al. (2007b), avaliando diferentes genótipos de soja, observaram a formação do apressório entre quatro e seis horas após a inoculação. Os mesmos autores sugerem que a percentagem de germinação de uredosporos e de formação de apressórios possa estar relacionada ao genótipo avaliado, uma vez que foram demonstradas diferenças.

A penetração ocorre diretamente através da cutícula (KOCH et al., 1983). Zambenedetti et al. (2007b), em todos os cultivares avaliados, observaram que a penetração ocorreu sempre na

junção das células da epiderme; também verificaram baixa penetração pelos estômatos e, quando o fato ocorreu, não observaram a formação de apressórios.

As células epidérmicas inicialmente invadidas pelo fungo mostram sinais claros de colapso. A colonização ocorre por crescimento miceliano intercelular. A infecção pode ocorrer em qualquer lado da folha e resulta em haustórios inseridos nas células do mesófilo. Lesões, macroscopicamente visíveis, podem ser observadas em torno de seis dias após a inoculação. A formação de lesões angulares se dá em função de o crescimento das hifas do fungo, normalmente, ser restrito às nervuras da folha (REIS et al., 2006).

A primeira evidência da formação das urédias se dá por uma agregação de hifas, formando o primórdio uredial. Essas estruturas são visíveis oito a nove dias após a inoculação (ZAMBENEDETTI, 2005; REIS et al., 2006). A produção de uredosporos inicia-se três a quatro dias mais tarde, onde ocorre a liberação dos uredosporos na superfície da folha. Novas urédias podem formar-se até o 28º dia após a inoculação (REIS et al., 2006).

2.1.3 Epidemiologia e sintomatologia

Para que se desenvolva uma epidemia da ferrugem da soja é necessário um período de molhamento foliar contínuo por no mínimo seis a sete horas e temperaturas, no período, entre 18 a 26,5 °C, considerando que uredosporos viáveis estejam depositados sobre a superfície das folhas da soja. A temperatura mínima que permite a formação de uma lesão é de 10 °C. Nenhuma lesão foi formada

quando a temperatura esteve acima de 28,5 °C. Condições ideais para que o processo de infecção ocorra encontram-se em torno de 12 horas de molhamento foliar contínuo e temperaturas entre 16 e 26,5 °C (BROMFIELD, 1984; MELCHING et al., 1989; ALVES et al., 2007; BONDE et. al., 2007).

Os sintomas causados pela ferrugem da soja são bem distintos das ferrugens dos cereais como trigo e aveia. As frutificações não são tão evidentes, de modo a olho nu distinguem-se pústulas ferruginosas que conferem o nome comum a esse grupo de doenças. Os da ferrugem da soja são denominados de lesões, e não de pústulas como nas demais ferrugens, isso por que ocorre a necrose do tecido foliar e em cada lesão podem existir várias pústulas. Uma lesão da ferrugem da soja é composta por várias pústulas salientes cada uma com um poro central (REIS et al., 2006).

Os sintomas da ferrugem podem surgir em qualquer momento do ciclo de desenvolvimento da cultura (AZEVEDO et al., 2004).

Os primeiros sintomas da ferrugem são caracterizados por pequenos pontos cloróticos e após de coloração bronzeada ou parda (lesões com tamanho em torno de 0,5 mm²) que podem escurecer a medida que envelhecem. Individualmente, com o passar do tempo, essas lesões aumentam de tamanho, podendo atingir até 1,2 mm² (REIS et al., 2006).

No local correspondente ao ponto escuro observa-se uma minúscula protuberância, normalmente, na face inferior do folíolo de soja, sendo esta o início da formação da estrutura de frutificação do fungo (urédia ou pústula). Progressivamente, esta estrutura, de uma

coloração hialina, vai adquirindo uma coloração castanho-clara a castanho-escuro, onde em sua extremidade se abrirá um pequeno poro para liberação dos uredosporos (YORINORI et al., 2004; REIS et al., 2006).

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

Maior número de urédias desenvolve-se na face inferior do que na face superior do folíolo de soja. Reis et al. (2002) demonstraram, para vários cultivares, que o número médio de lesões cm^{-2} na face superior do folíolo foi de 10,53 e na face inferior foi de 15,33.

À medida que prossegue a esporulação, o tecido da folha, ao redor das pústulas, passa para uma coloração castanho-clara ou ainda para uma coloração castanho-avermelhada, onde são definidas as lesões características à doença, visíveis em ambas as faces da folha (YORINORI et al., 2004).

Avaliações de resistência à ferrugem da soja podem ser conduzidas com base na reação do hospedeiro ao patógeno, conforme: lesão tipo TAN (lesão marrom-amarelada ou bronzeada) = completa suscetibilidade; lesão tipo RB (lesão marrom-avermelhada, com bordos definidos) = resistência; imune = nenhum sintoma visível (MILES et al., 2006). Koga et al. (2008) associam, ainda, para seleção de diferentes genótipos, o tipo MX (misto) = presença dos dois tipos de lesão na mesma folha, conforme proposto por Bromfield (1984).

As primeiras lesões, em geral, são encontradas nas folhas baixas da planta de soja. O amarelecimento prematuro e a abscisão foliar podem ocorrer em função do aumento da densidade de lesões. Em pecíolos e hastes jovens podem ser observadas lesões alongadas. O estágio final da epidemia da ferrugem da soja numa lavoura caracteriza-se, normalmente, por amarelecimento geral das folhas, seca e intensa desfolha (REIS et al., 2006).

O rápido amarelecimento, bronzeamento e queda prematura de folhas, impedem a formação total dos grãos. Quanto mais precoce for a desfolha, maiores os danos sobre o rendimento de grãos e qualidade (grãos pequenos e verdes). Em caso de desfolha, ainda nos estádios vegetativos, pode ocorrer aborto de flores e queda prematura de vagens (YORINORI et al., 2004).

2.1.4 Hospedeiros da ferrugem da soja

Naturalmente, *P. pachyrhizi* infecta mais de 95 espécies de plantas dentro de mais de 42 gêneros, incluindo a soja e espécies do gênero *Glycine*. Incluem-se nesta lista muitas plantas daninhas e legumes comestíveis. Inclui-se, também, o kudzu (*Pueraria lobata* (Willd) Ohwi), o qual se encontra disperso em algumas regiões onde se cultiva a soja e serve como um importante hospedeiro (fonte de inóculo) para a ferrugem da soja, principalmente, quando a cultura não está implantada (MILES et al., 2003). Slaminko et al. (2008) avaliando hospedeiros de *P. pachyrhizi*, conduziram experimento com 176 espécies, dentro de 57 gêneros da família Fabaceae, nativas ou introduzidas em regiões onde se cultiva soja nos Estados Unidos da

América, e confirmaram a introdução de 65 novas espécies, dispersas em 25 gêneros, 12 dos quais não haviam ainda sido reportados.

2.1.5 Danos no hospedeiro (*G. max*)

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

Kochman (1979) e Ogle et al. (1997) mencionam danos pela ferrugem da soja, descritos por diversos pesquisadores, em diferentes regiões do mundo, entre 10% e 80%. Relatos de danos, em áreas experimentais na Austrália, Japão, China e Filipinas variam de 5% a 95% (HARTMAN et al., 1999). Kawuki et al. (2003), em Uganda, descrevem danos em variedades comerciais entre 15,1% e 22,9%. No Paraguai, Morel (2001) cita danos de 50%.

O efeito da ferrugem sobre o rendimento da cultura da soja dependerá, também, do estágio de crescimento da cultura no qual a ferrugem se instalou e do tempo em que o processo doença se estendeu durante o cultivo. Infecções muito precoces podem levar a

uma desfolha prematura do cultivo e subseqüentes danos (OGLE et al., 1979). Os maiores danos são atribuídos à desfolha das plantas e são mais severos quando a infecção ocorre logo após o início da floração (BROMFIELD, 1984).

2.1.6 Medidas de controle

As medidas de controle para a ferrugem da soja, em função da não disponibilidade de cultivares com resistência genética ao fungo, com nível suficiente para evitar danos, estão direcionadas para o controle químico e para o manejo de fontes de inóculo (hospedeiros secundários ou plantas voluntárias de soja) fora da estação de cultivo da soja. Também se sugere o uso de cultivares de ciclo precoce e semeadura no início da época recomendada (REUNIÃO, 2008; TECNOLOGIAS, 2008).

2.1.6.1 Controle cultural

A recomendação de medidas de controle cultural no controle de fitopatógenos fundamenta-se na exploração dos pontos vulneráveis do seu ciclo de vida, principalmente em sua fase de sobrevivência. As principais medidas, segundo Reis et al. (2006), envolvem:

- a) O principal mecanismo de sobrevivência de *P. pachyrhizi* é o parasitismo de plantas vivas (plantas voluntárias) no período em que o hospedeiro principal não está sendo cultivado, motivo pelas quais as mesmas deveriam ter suas populações

reduzidas ou eliminadas. Esta medida é identificada pela prática do vazio sanitário, estabelecida à maioria dos estados produtores de soja no Brasil, que consiste num período pré-definido no qual não se permite a manutenção de plantas de soja vivas na lavoura, a fim de que se obtenha uma redução da quantidade de inóculo da ferrugem para os cultivos da safra principal, no caso, a de verão (TECNOLOGIAS, 2008).

- b) Outra fonte de inóculo são os hospedeiros secundários. No Rio Grande do Sul o kudzu tem sido citado como sendo o hospedeiro secundário de maior importância, nos municípios de Carazinho, Santa Cruz do Sul e Caxias do Sul, justificando-se a eliminação dessas fontes. No município de Sertão (RS) foi observada a ferrugem da soja sobre soja perene (*Neonotonia wightii* (Wight & Arn.)) (REIS, 2007 - comunicação pessoal);
- c) Manejo da irrigação: evitar aumentar, pela irrigação, a duração diária do molhamento foliar causado pelo orvalho;
- d) Dar preferência a cultivares de ciclo mais precoce e semeaduras no início das épocas preferenciais de semeadura (menor intensidade da doença em função de menor disponibilidade de inóculo na área e em função do período que a planta fica a campo exposta aos eventos).

2.1.6.2 Controle genético

Inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de selecionar genótipos promissores em busca de fontes de resistência à ferrugem da soja (YORINORI et al., 2004).

Cinco genes que condicionam resistência vertical foram relatados na literatura (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5*) (McLEAN & BYTH, 1980; BROMFIELD & HARTWIG, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; GARCIA ET AL., 2008), mas não foram duráveis quanto à eficiência da resistência a campo. A busca de genótipos com resistência horizontal ou taxa reduzida de progresso da doença tem sido alvo de estudos. Koga et al. (2008) avaliando tipo de lesão, número de lesões e de urédias, produção de uredosporos, entre outros, selecionaram diferentes grupos de genótipos com diferentes reações à ferrugem, sendo considerados promissores como fontes de genes de resistência à ferrugem asiática da soja.

Os cultivares de soja TMG 801 - INOX[®] e TMG 803 - INOX[®] e BRSGO 7560, com resistência à ferrugem asiática da soja, já estão sendo disponibilizados aos agricultores, em determinadas regiões brasileiras, na presente safra de cultivo (FUNDAÇÃO MT, 2009; LANDGRAF, 2009).

2.1.6.3 Controle químico

Embora a utilização de fungicidas não se constitua na única medida de controle para a ferrugem da soja, o uso destes, ainda, tem sido a prática mais eficiente no controle de epidemias da doença, auxiliando, desta forma, na manutenção das produtividades na cultura.

A aplicação de fungicidas em pulverização da parte aérea da cultura tem sido a preconizada e mais freqüente, embora o uso de fungicida, para o controle da ferrugem da soja, através do tratamento

de semente já faça parte da recomendação em sistemas de produção para o cultivo da soja na região central do Brasil (REUNIÃO, 2008; TECNOLOGIAS, 2008).

Os ingredientes ativos dos fungicidas registrados para o controle da ferrugem da soja no Brasil, até a presente data, em pulverização na parte aérea da cultura, isolados e/ou em mistura são: azoxistrobina, ciproconazol, difenoconazol, epoxiconazol, fluquinconazol, flutriafol, metconazol, miclobutanil, picoxistrobina, propiconazol, protioconazol, tebuconazol, tetraconazol, azoxistrobina + ciproconazol, carbendazim + flutriafol, ciproconazol + picoxistrobina, ciproconazol + propiconazol, ciproconazol + trifloxistrobina, epoxiconazol + piraclostrobina, flutriafol + tiofanato metílico, propiconazol + trifloxistrobina e tebuconazol + trifloxistrobina, totalizando 54 formulações comerciais. Para o tratamento de sementes encontra-se registrado o princípio ativo fluquinconazol, em apenas uma formulação comercial (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009).

Não há, até o momento, um consenso quanto a um (ou mais) critério indicador para a tomada de decisão do controle químico da ferrugem da soja, na parte aérea da cultura, no Brasil.

A decisão sobre o momento do controle é variável e se apóia em distintas situações, como se pode observar: preventivamente (“zero” doença na lavoura) a partir do surgimento da doença em lavouras na região ou, ainda, independente desta confirmação; controle curativo (pós infecção e pré-sintoma); controle erradicativo (pós-sintomas), adotando-se ou não um limiar de ação; com base no estágio fenológico da cultura, nas condições climáticas da região, na

época de semeadura, no ciclo do cultivar, na presença de outras doenças na lavoura, no custo da aplicação, na eficácia do fungicida escolhido, na logística de aplicação, entre outros (YORINORI et al., 2004; REIS et al., 2006; REUNIÃO, 2008; TECNOLOGIAS, 2008).

2.2 Fungitoxicidade e sensibilidade

Fungicidas são substâncias químicas de origem natural ou sintética que quando aplicadas às plantas protegem-nas da penetração e/ou posterior desenvolvimento de fungos patogênicos e microrganismos pertencentes ao reino Stramenopila (antigos fungos da classe Oomicetos), em seus tecidos. Este conceito tem sido ampliado com o surgimento de novas substâncias químicas, que controlam doenças causadas por fungos, que não atuam diretamente sobre o agente causal da doença, mas que atuam como ativadores de mecanismos de defesa das plantas (GHINI & KIMATI, 2000; NOJOSA et al., 2005; REIS et al., 2007).

A fungitoxicidade é uma propriedade inerente a uma substância química e se caracteriza pela toxicidade aos fungos em baixas concentrações (REIS et al., 2007). Toxicidade é a capacidade que uma substância química apresenta de produzir um efeito nocivo sobre um sistema biológico, alterando funções ou levando o organismo à morte, sob determinada condição de exposição (OGA et al., 2008).

Edgington et al. (1971) propõem os seguintes critérios para enquadrar uma substância fungicida, com relação à fungitoxicidade: substância que apresenta $DE_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ = altamente

fungitóxica; com DE_{50} entre 1 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} = moderadamente fungitóxica e com $DE_{50} > 50 \text{ mg L}^{-1}$ = não tóxica.

O termo DE_{50} corresponde à dose efetiva ou eficaz que promove um efeito desejado (ou grau de resposta) em 50% dos microrganismos submetidos ao ensaio experimental (SILVA, 2006; OGA et al., 2008). O termo CE_{50} (concentração efetiva), também utilizado para expressar o grau de toxicidade de uma substância, representa a concentração de um composto químico onde 50% de seu efeito máximo é observado. No caso, uma dose que reduza o crescimento miceliano ou, ainda, a germinação de esporos potencialmente viáveis a um valor de 50% do crescimento (ou germinação), na ausência do fungicida. Esses valores, muitas vezes, são referidos como IC_{50} (inibição do crescimento) (SHARVELLE, 1961; RUSSEL, 2004; REIS et al., 2007).

Outros parâmetros utilizados para expressar o grau de toxicidade de substâncias químicas sobre um sistema biológico são a DL_{50} (dose letal) ou, ainda, a CL_{50} (concentração letal) que correspondem à dose/concentração necessária para levar à morte 50% dos organismos em teste. Também é utilizada a CMI (Concentração Mínima Inibitória), muitas vezes referida como dose ou concentração limite. Esta representa a concentração mínima de uma substância química necessária para inibir o crescimento de um microrganismo ou produzir uma resposta detectável numa população em teste (SHARVELLE 1961; TORGESON, 1967; LOOMIS, 1995; RUSSEL, 2004; SILVA, 2006; OGA et al., 2008).

A DE_{50} é específica e constante para uma determinada substância química e para um determinado patógeno. A substância é

fungicida em concentração baixa, sendo que um valor baixo da DE_{50} representa uma alta ação fungicida (REIS et al., 2007). Loomis (1995), quando descreve sobre a toxicidade de uma droga, emprega o termo “potente” para uma substância química, se a dose requerida para produzir qualquer efeito estiver numa faixa muito baixa.

A descrição da potência e da eficácia de um fungicida pode ser demonstrada pela curva de dose-resposta, onde são definidos os valores das doses/concentrações efetivas (TORGESON, 1967). A posição da curva de dose-resposta, no eixo da dose, representa o índice da potência da droga, indicando a quantidade da droga para produzir determinado efeito. Comparativamente a outra droga, a curva que se situar à direita indicará potência inferior. Se a DE_{50} de um composto “A” for maior que a DE_{50} de um composto “B” pode-se inferir que o composto “A” é menos potente que o composto “B”. O limite superior da curva da dose-resposta indica a eficácia do fungicida (droga) e refere-se à resposta máxima que pode ser provocada por ele. Normalmente, a eficácia de uma droga se constitui no fator mais decisivo para sua escolha (HUGHES, 1996; SILVA, 2006).

Uma substância química em função de suas características, inerentes à molécula química, apresenta fungitoxicidade. Por outro lado, um fungo, em função de suas características genéticas apresenta, ou não, sensibilidade a uma dada molécula. Se um fungo for sensível a um fungicida, este apresenta fungitoxicidade; em caso contrário, é atóxico. Se o fungicida não apresenta fungitoxicidade, o fungo é, então, considerado insensível (REIS et al., 2007).

Ghini e Kimati (2000) definem o termo sensibilidade como o oposto de resistência, quando descrevem que fungos resistentes a fungicidas apresentam uma redução na sensibilidade. A resistência a fungicidas é definida como uma alteração herdável e estável em um fungo em resposta à aplicação de um fungicida, resultando numa redução da sensibilidade ao produto. Os autores ainda sugerem que o termo insensibilidade não deva ser utilizado como sinônimo de resistência, uma vez que o termo sugere a completa falta de sensibilidade, o que não se observa na prática. Logo, dever-se-ia utilizar o termo insensibilidade para descrever fungos para os quais um fungicida nunca apresentou efeito. Nem todos os fungos são sensíveis a todos os fungicidas (espectro de ação); alguns sempre serão insensíveis a certas moléculas (REIS et al., 2007).

Se a DE_{50} de um fungicida, ao longo do tempo, apresentar alteração para valores superiores aos inicialmente estabelecidos, visando ao controle de um determinado patógeno, poderá indicar redução na sensibilidade aquele fungicida (REIS et al., 2007).

2.2.1 Metodologias utilizadas para avaliação da fungitoxicidade de um fungicida

Várias metodologias têm sido descritas para mensuração da fungitoxicidade de uma substância química (AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 1947; SHARVELLE, 1961; GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004), tendo como objetivo o estudo, em si, da sensibilidade de um fungo a um determinado

fungicida ou ainda o monitoramento da redução parcial ou mesmo a perda desta sensibilidade (resistência).

Estas técnicas devem compreender ensaios *in vitro* ou *in vivo*, obedecendo, a princípio, as seguintes características: serem seguras, reproduzíveis, de simples operação em termos de praticidade e habilidade nas tecnologias utilizadas, de baixo custo e serem capazes de reproduzir as respostas de sensibilidade obtidas, nos testes *in vitro* ou *in vivo*, em situações de campo (RUSSEL, 2004).

2.2.1.1 Testes *in vitro*

Testes *in vitro* podem ser direcionados tanto para patógenos necrotróficos (não obrigatórios) como para biotróficos (obrigatórios), embora, na sua maioria, envolvem os necrotróficos, em função da possibilidade de cultivo desses fungos em meio de cultura, ficando os biotróficos restritos à avaliação da germinação dos esporos. A exceção, dentro dos biotróficos, fica para *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary onde, testes avaliando crescimento miceliano são possíveis, em função de meio de cultura específico (TORGESON, 1967; GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004).

Se o patógeno alvo do estudo pode, facilmente, ser cultivado em um meio de cultura, então os testes para a determinação de uma curva “dose-resposta”, para um fungicida, na maioria das vezes, serão desenvolvidos nestas condições. Normalmente, estes testes envolvem a utilização de meios de cultura sólidos, contudo, a utilização de meios líquidos também se torna possível, embora com restrições. As variáveis quantificadas incluem desde mensuração do

crescimento miceliano, germinação de esporos, comprimento do tubo germinativo, morfologia do tubo germinativo ou, até mesmo, incremento de turbidez (meio de cultura líquido) (GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004).

Testes avaliando a fungitoxicidade também podem ser desenvolvidos através da incorporação de uma suspensão de esporos a diferentes concentrações do fungicida teste. Fica esta técnica limitada a patógenos que esporulam facilmente e que não apresentam restrição à germinação na ausência de oxigênio. A tendência de agregação dos esporos que se depositam no fundo do local onde será procedido o teste (cavidade de uma lâmina, tubo de ensaio), dificulta a avaliação (SHARVELLE, 1961). O mesmo autor também faz referência a um teste modificado, onde se utiliza o meio de cultura sólido, contudo com sobreposição de discos de papel filtro, embebidos nas devidas concentrações do fungicida em teste e, sobre estes, a deposição da suspensão de esporos.

2.2.1.2 Testes *in vivo*

Ensaio *in vivo* são necessários para aqueles patógenos biotróficos, nos quais procedimentos *in vitro* não estejam compatíveis com os objetivos almejados. Esses ensaios também podem ser utilizados para patógenos necrotróficos, se a utilização de técnicas *in vitro* for considerada inapropriada (RUSSEL, 2004).

Algumas metodologias estão disponíveis e a escolha por uma delas dependerá do patógeno alvo e propriedades do fungicida. Estas, normalmente, incluem partes da planta destacadas

(principalmente folhas), discos ou segmentos de folhas depositados sobre um meio de cultura contendo o fungicida ou em suspensão sobre uma solução do fungicida, ou, ainda, plântulas inteiras (GHINI & KIMATI, 2000; RUSSEL, 2004).

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

2.2.1.3 Avaliação dos resultados

Ensaio de fungitoxicidade ou de monitoramento da perda de sensibilidade são definidos através de parâmetros como DE_{50} , DL_{50} , CL_{50} , CE_{50} , CI_{50} ou CMI (SHARVELLE 1961; TORGESON, 1967; LOOMIS, 1995; RUSSEL, 2004; SILVA, 2006; OGA et al., 2008).

Estes parâmetros podem, também, ser utilizados para classificar e comparar a toxicidade entre as moléculas testadas, através de índices como potência e eficácia (LOOMIS, 1995; HUGHES, 1996; SILVA, 2006; OGA et al., 2008).

Valores do tipo “dose-resposta” são obtidos quando da avaliação da fungitoxicidade de uma molécula. A partir dos valores das doses e das respectivas respostas, identifica-se uma relação entre ambas e com base nessa relação estima-se uma dose efetiva (DE), ou letal (DL), por exemplo, que afetará “x” percentual da população em estudo. Um conjunto de métodos que permite analisar dados qualitativos desta natureza é a análise de probit (LOOMIS, 1995; LOPES & OLIVEIRA, 2009).

CAPÍTULO I

EFEITO DE SUBSTRATO, TEMPERATURA, TEMPO DE EXPOSIÇÃO E FOTOPERÍODO NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DO TUBO GERMINATIVO DE UREDOSPOROS DE *Phakopsora pachyrhizi* IN VITRO

MARTA MARIA CASA BLUM¹ E ERLEI MELO REIS²

RESUMO - Ensaios avaliando substrato, fotoperíodo, temperatura e tempo de exposição sobre a germinação e o crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro*, foram desenvolvidos com o objetivo de gerar informações para trabalhos futuros com testes de fungitoxicidade. Foram avaliados os substratos ágar-água, BDA (batata-dextrose-ágar) (25%), BDA (50%), BDA (100%), extrato de folha de soja e extrato de folha de kudzu; as temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C; os tempos de exposição de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 h e de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 h e dois ensaios avaliando fotoperíodo com regimes diferenciados de luz e escuro (um com alternância de três horas e outro com alternância de uma hora). O substrato ágar-água, na avaliação da germinação e do comprimento do tubo germinativo, apresentou-se como a melhor opção para condução de testes *in vitro*, com *P. pachyrhizi*. A

¹Engenheira Agrônoma, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia - martablum@gmail.com

²Orientador, Eng. Agr., Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF - erleireis@tpo.com.br

germinação máxima dos uredosporos de *P. pachyrhizi* foi obtida nas temperaturas de 21,8 e 22,3 °C e os comprimentos máximos mensurados para os tubos germinativos foram obtidos nas temperaturas de 21,4 e 22,1 °C, para a primeira e segunda vez em que o experimento foi conduzido, respectivamente. Identificou-se o tempo de 6,4 horas para a obtenção da germinação máxima dos uredosporos e o tempo de 37,7 h para o máximo crescimento dos tubos germinativos, *in vitro*. O crescimento dos tubos germinativos foi linear, quantificando-se um crescimento médio, para cada hora de exposição, de 45 µm. Na ausência de luz foram observadas as germinações máximas e os máximos comprimentos dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*. A exposição à luz contínua não inibiu, totalmente, a germinação e nem o crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

Palavras-chave: ferrugem asiática da soja, *Glycine max* (L.) Merr., metodologia.

**EFFECT OF SUBSTRACT, PHOTOPERIOD, TEMPERATURE
AND EXPOSURE TIME ON THE GERMINATION AND
UREDOSPORES GERMINATIVE TUBE GROWTH OF
Phakopsora pachyrhizi IN VITRO**

MARTA MARIA CASA BLUM AND ERLEI MELO REIS

ABSTRACT - Assays evaluating substract, photoperiod, temperature and exposure time on the germination and uredosporos germinative

tube growth of *P. pachyrhizi*, *in vitro*, were conducted to obtain information for future work with fungitoxicity tests. Substrates were evaluated: agar-water, PDA (potato-dextrose-ágar) (25%), PDA (50%), PDA (100%), soybean leaf extract and kudzu leaf extract; the temperatures of 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C; the exposure times of 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 and 40 h and of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 h and two trials evaluating fotoperiods with different light and darkness exposure (one with with a three hour alternation and other with a hour alternation). The agar-water substract, on the germination and germinative tube length evaluations, was the best option to the testing with *P. pachyrhizi in vitro*. The maximum *P. pachyrhizi* uredospores germination was obtained at 21.8 and 22.3 °C and the maximum length measured for the germinative tubes were obtained with 21.4 and 22.1 °C, to the first and the second time the experiment was conducted, respectively. The best time for the maximum uredospores germination was of 6.4 hours and of 37.7 h to the maximum germinative tube growth, *in vitro*. The germinative tube growth was linear, quantifying a medium growth, to each hour of exposure, of 45 µm. In the absence of light, were observed the maximum germinations and the maximum uredospore germinative tube lengths of *P. pachyrhizi*. The exposure to continue light did not inhibited, totaly, the *P. pachyrhizi* germination neither the uredospores germinative tube growth.

Key-words: asian soybean rust, *Glycine max* (L.) Merr., methodology.

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd., agente causal da ferrugem asiática da soja, é um fungo biotrófico que não se desenvolve em meio de cultura. Normalmente, para fins de pesquisa, a manutenção e/ou multiplicação de uredosporos é obtida através de inoculações sucessivas em plantas de soja. Além da soja, sua manutenção pode ser conduzida sobre plantas de kudzu (*Pueraria lobata* Willd.), hospedeiro secundário, encontrado no sul do Brasil. Outra possibilidade reside na preservação dos uredosporos a baixas temperaturas, tendo como vantagem a manutenção da identidade genética do isolado, assim como, redução de tempo, espaço físico e mão-de-obra para manutenção do patógeno (FURTADO et al., 2005; ALVES et al., 2006; ZAMBENEDETTI et al., 2007a).

A avaliação da sensibilidade de um fungo a uma substância química (ex: fungicida), *in vitro*, com a utilização de um substrato artificial, é uma prática descrita na literatura, principalmente para fungos necrotróficos, onde, normalmente, se quantifica o crescimento miceliano, sob diferentes concentrações fungicidas. A limitação de uso desta metodologia está para os fungos biotróficos onde somente podem ser avaliados com base na germinação de seus esporos e/ou na mensuração do comprimento dos tubos germinativos (RUSSEL, 2004).

Para ambos os grupos, necrotróficos ou biotróficos, quando se tem como objetivo a determinação da sensibilidade de um fungo a um fungicida *in vitro*, tornam-se necessários identificar, entre outros fatores, substratos, temperatura para desenvolvimento do

fungo, fotoperíodo e tempo de exposição necessário, a determinada condição de ambiente, para que se promova a máxima taxa de germinação dos esporos, o máximo crescimento do tubo germinativo ou, ainda, crescimento miceliano e esporulação.

Portanto, este trabalho teve como objetivo selecionar substrato, temperatura, tempo de exposição e fotoperíodo que proporcionasse máxima germinação e crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos seis ensaios, *in vitro*, no laboratório de Fitopatologia (Micologia) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo - UPF (Passo Fundo/RS), nos anos de 2006 e 2007, para a seleção de um substrato, uma temperatura, um tempo de exposição e um fotoperíodo que proporcionasse máxima germinação e crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

O inóculo da ferrugem da soja, proveniente de uma amostra da população de uredosporos, obtida de plantas naturalmente infectadas na safra de 2004/05, no campo experimental da FAMV-UPF, foi mantido e multiplicado em plantas de soja (cultivar BRS 154), em ambiente parcialmente controlado (22 ± 2 °C e 14 horas de fotoperíodo).

Os uredosporos de *P. pachyrhizi*, utilizados para teste, foram removidos dos folíolos de soja por agitação, manual, em água

destilada com duas gotas.L⁻¹ do surfactante Tween 20 (marca registrada).

Utilizaram-se placas de Petri de tamanho 60 x 15 mm (esterilizadas e descartáveis) onde, sobre o substrato, depositou-se um mL de uma suspensão de uredosporos (2×10^3 uredosporos por placa). Os substratos utilizados foram autoclavados e vertidos nas placas de Petri com antecedência, mínima, de 24 horas da deposição da suspensão dos uredosporos.

Foram quantificados a germinação e o comprimento do tubo germinativo dos uredosporos de *P. pachyrhizi*. A unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento. Para a variável germinação foram observados 100 uredosporos por repetição. Para o comprimento do tubo germinativo foram mensurados 50 uredosporos por repetição. O uredosporo foi considerado germinado quando apresentou tubo germinativo de comprimento maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

Decorridos os tempos previstos para a execução de cada experimento, a germinação e o crescimento dos tubos germinativos foram interrompidos adicionando-se 0,3 mL de uma solução de acetona (100%) e corante azul de algodão, em cada placa de Petri. Após, as placas foram mantidas em refrigerador (4 °C), para posterior avaliação.

Os trabalhos de incubação foram conduzidos em câmara incubadora tipo DBO (Demanda Biológica de Oxigênio), com controle de temperatura e fotoperíodo, e a quantificação da germinação dos uredosporos e a mensuração do comprimento dos

tubos germinativos foram realizados com o auxílio de microscópio ótico (com retículo micrométrico adaptado à ocular), através de varredura da placa de Petri.

Todos os ensaios foram conduzidos por duas vezes (experimentos 1 e 2), com exceção do ensaio para determinação de substratos que foi conduzido por três vezes (experimentos 1, 2 e 3).

2.1 Efeito de substratos sobre a germinação e sobre o comprimento dos tubos germinativos de uredosporos de *P. pachyrhizi*

Neste ensaio foram comparados seis substratos: ágar-água (10 g de ágar em 1.000 mL de água destilada), batata-dextrose-ágar (BDA) a 25%, batata-dextrose-ágar a 50%, batata-dextrose-ágar a 100%, extrato de folha de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (um grama de folha de soja fresca triturada no liquidificador, em 1.000 mL de água destilada e 10 g de ágar) e extrato de folha de kudzu *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi (um grama de folha de kudzu fresca triturada no liquidificador, em 1.000 mL de água destilada e 10 g de ágar). Após a deposição da suspensão dos uredosporos de *P. pachyrhizi* sobre os diferentes substratos, estes foram colocados para incubação à temperatura de 22 °C, escuro contínuo, durante seis horas.

Observou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo realizada a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

2.2 Determinação da temperatura ótima para a germinação e para o crescimento dos tubos germinativos de uredosporos de *P. pachyrhizi*

Neste ensaio foram avaliadas as seguintes temperaturas: 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C. A deposição da suspensão dos uredosporos de *P. pachyrhizi* foi sobre substrato ágar-água, sendo incubados em escuro contínuo, durante seis horas, nas diferentes temperaturas.

Observou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo os dados submetidos à análise de variância e de regressão, para a descrição do efeito da temperatura sobre a germinação de uredosporos e comprimento dos tubos germinativos. A temperatura ideal foi determinada pelo cálculo do ponto de máximo das curvas.

2.3 Determinação do tempo de exposição para avaliação da germinação máxima e do crescimento máximo dos tubos germinativos de uredosporos de *P. pachyrhizi*

Num ensaio foram avaliados os tempos de exposição, para a germinação dos uredosporos, de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, e 40 horas. Posteriormente, num outro ensaio, com base nos resultados já obtidos, foram avaliados os tempos de exposição de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas. A deposição da suspensão dos uredosporos de *P. pachyrhizi* foi sobre substrato ágar-água, sendo mantidos em escuro contínuo, na temperatura de 22 °C, sob os diferentes tempos de exposição. À

medida que os tempos de exposição, para o teste de germinação, se completavam, as quatro repetições, do tratamento em questão, eram retiradas da câmara de incubação e paralisadas a germinação e o crescimento do tubo germinativo dos uredosporos.

Observou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo os dados submetidos à análise de variância e de regressão.

2.4 Efeito do fotoperíodo sobre a germinação e o crescimento dos tubos germinativos de uredosporos de *P. pachyrhizi*

Para avaliação do efeito do fotoperíodo, sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, foram conduzidos dois ensaios, onde diferentes combinações de exposição à luz e ao escuro, totalizando 6 horas, foram testadas. Utilizou-se iluminação artificial, fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes (Philips TL-D 15W/75-650), distantes 10 cm das placas, componentes da câmara incubadora. A iluminação na câmara de incubação foi contínua, obtendo-se o efeito da ausência de luz (escuro) pela embalagem de cada placa de Petri com duas camadas de papel alumínio.

No primeiro ensaio quatro tratamentos foram avaliados, conforme: 3 h de escuro seguidas de 3 h de luz; 6 h de escuro; 3 h de luz seguidas de 3 h de escuro e 6 h de luz. Em outro ensaio, foram avaliados doze tratamentos, definindo-se por aumento gradativo de exposição ao escuro em relação à luz e à luz em relação ao escuro, conforme: 1 h de escuro seguida de 5 h de luz; 2 h de escuro seguidas

de 4 h de luz; 3 h de escuro seguidas de 3 h de luz; 4 h de escuro seguidas de 2 h de luz; 5 h de escuro seguidas de 1 h de luz; 6 h de escuro; 1 h de luz seguida de 5 h de escuro; 2 h de luz seguidas de 4 h de escuro; 3 h de luz seguidas de 3 h de escuro; 4 h de luz seguidas de 2 h de escuro; 5 h de luz seguidas de 1 h de escuro e 6 h de luz. A suspensão dos uredosporos de *P. pachyrhizi* foi depositada sobre substrato ágar-água, sendo aqueles submetidos à temperatura de 22 °C, durante 6 horas, nos diferentes fotoperíodos.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo realizada a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de substratos

Por ocasião do primeiro experimento não foram observadas diferenças entre os substratos testados sobre a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* (Tabela 1). Para o comprimento do tubo germinativo foram observadas diferenças, sendo que os substratos ágar-água e extrato de folha de soja apresentaram crescimento superior ao BDA 100%. BDA 25%, BDA 50% e extrato de folha de kudzu não diferiram de BDA 100%. Extrato de folha de soja não diferiu de BDA 25%, BDA 50% e extrato de folha de kudzu (Tabela 2).

No segundo experimento também não foram observadas diferenças entre os substratos testados sobre a germinação dos uredosporos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de substratos sobre a germinação de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (6 h de exposição; escuro; 22 °C)

Substrato	Germinação (%)		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Ágar-água	61,47 n.s.	55,50 n.s.	60,00 a
BDA 25%	52,00	57,00	59,50 ab
BDA 50%	62,00	60,00	59,00 ab
BDA 100%	55,00	56,00	49,50 b
Extrato folha soja	67,05	58,00	68,00 a
Extrato folha kudzu	61,50	54,50	62,50 a
C.V. (%)	11,10	7,12	7,37

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey (p=5%)

Tabela 2. Efeito de substratos sobre o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (6 h de exposição; escuro; 22 °C)

Substrato	Comprimento tubo germinativo (µm)		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Ágar-água	273,50 a	197,30 b	178,70 a
BDA 25%	214,30 bc	236,10 a	186,30 a
BDA 50%	229,45 bc	223,70 ab	190,20 a
BDA 100%	195,85 c	158,25 c	119,95 b
Extrato folha soja	238,50 ab	203,95 ab	171,20 a
Extrato folha kudzu	227,75 bc	205,15 ab	170,80 a
C.V. (%)	6,74	7,09	5,21

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey (p=5%)

Para o comprimento do tubo germinativo (Tabela 2) foram observadas diferenças, sendo o substrato BDA 100% o que possibilitou o menor crescimento dos tubos germinativos. BDA 25% apresentou crescimento superior ao substrato ágar-água e ao de BDA 100%, não diferindo dos extratos de folha de kudzu e de folha de soja e nem de BDA 50%.

No terceiro experimento os substratos com extratos de folhas de soja e kudzu e o de ágar-água foram superiores ao BDA 100%, mas não diferiram de BDA 25% e BDA 50%, para a germinação dos uredosporos (Tabela 1). Para o comprimento do tubo germinativo foi observada diferença entre o substrato BDA 100% e os demais, sendo que o BDA 100% proporcionou crescimento inferior do tubo germinativo (Tabela 2).

Trabalhos avaliando diferentes substratos sobre a germinação, *in vitro*, de uredosporos de *P. pachyrhizi* não foram, até o momento, relatados.

Mueller et al. (2005), em testes de fungitoxicidade, utilizaram BDA (100%), na quantificação da viabilidade dos uredosporos de *Puccinia hemerocallidis* Thüm.

Stadnik et al. (2005) avaliando diferentes substratos sobre a germinação de uredosporos de *Puccinia graminis* Pers. recupera os maiores valores de germinação em solução de dextrose a 2% e quitosana a 100 mg L⁻¹.

Reis e Richter (2007) descrevem o efeito de nove diferentes substratos sobre a germinação e comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *Puccinia triticina* Erikss., incluindo ágar-água, batata-sacarose-ágar (25% e 100%) e extrato de folha de

trigo, e concluem que os substratos a base de extrato e infusão de folhas são superiores ao substrato padrão ágar-água, o que não foi constatado para os substratos a base de folhas, nas concentrações testadas, no presente trabalho.

Kochman e Brown (2008) observaram maiores índices de germinação de uredosporos de *Puccinia graminis avenae* Erikss. & Henn. e *Puccinia coronata avenae* Fraser & Led., *in vitro*, em substrato ágar-água quando foi comparada a germinação sobre folhas de aveia.

Rossi et al. (2008), testando substratos sobre a germinação de conídios de *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl., incluindo ágar-água e cocção de folhas de mamoeiro, não observaram diferenças entre estes.

O substrato ágar-água tem sido freqüentemente utilizado para avaliação da viabilidade de uredosporos *in vitro* (KOCHMAN, 1979; ELISSON et al., 1990; TAPSOBA & WILSON, 1997; TESSMAN & DIANESE, 2002; GODOY & FLAUSINO, 2004; FURTADO et al., 2005; SILVA & SOUZA, 2005; BONDE et al., 2007; GARCIA et al., 2007; ZAMBENEDETTI et al., 2007a; SOARES et al., 2008).

Russel (2004), descrevendo metodologia para testes de sensibilidade de fungos a fungicidas, *in vitro*, sugere a possibilidade de meios artificiais para a avaliação da viabilidade de esporos. Estes podem variar desde meios ricos em nutrientes como o meio de BDA ou o de extrato de malte, até meios deficientes como o ágar-água. Contudo, enfatiza que valores de sensibilidade podem variar em função do substrato utilizado. Também ressalta a possibilidade de

resultados diferentes, em termos de sensibilidade a fungicidas, em função do uso de variedades e estádios fenológicos diferentes, por ocasião de testes de sensibilidade *in vivo*.

Levando em consideração as informações de Russel (2004) e com base nos resultados obtidos, para os substratos aqui testados sobre a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, se pode inferir que o substrato ágar-água apresenta-se como a melhor opção para os testes *in vitro*. A limitação para os extratos de folhas (soja ou kudzu), apesar de não diferirem do tratamento ágar-água, estaria na padronização de uma variedade, por exemplo, ou até mesmo no estágio fenológico da planta. Além disso, dever-se-ia considerar a necessidade de manutenção do hospedeiro vivo (custo-benefício). Para avaliação do comprimento do tubo germinativo, os resultados para o substrato ágar-água são semelhantes aos observados para a germinação dos uredosporos, destacando-se, ainda, o meio de BDA 25%, em uma das repetições do experimento, o que, em função da utilização daquele substrato para quantificação de uma variável (germinação), não o limitaria para uso concomitante na avaliação de outra variável (comprimento do tubo germinativo).

3.2 Efeito da temperatura

A germinação máxima dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, estimada pelos modelos, foi obtida nas temperaturas de 21,8 °C e 22,3 °C, para o primeiro e segundo experimento, respectivamente (Figura 1). Para a temperatura de 10 °C foram observadas reduções na germinação na ordem de 75,7 e 79,2%; para 15 °C reduções 25,3 e

24,8%; para 20 °C reduções de 1,9 e 2,7%; para 25 °C reduções de 5,3 e 3,9%; para 30 °C reduções de 35,8 e 31,2% e para 35 °C reduções de 93,2 e 84,7%, respectivamente, no primeiro e segundo experimento.

O comprimento máximo mensurado para os tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi* foi obtido nas temperaturas de 21,4 e 22,1 °C, para o primeiro e segundo experimento, respectivamente (Figura 2). Para a temperatura de 10 °C foram observadas reduções no comprimento do tubo germinativo na ordem de 54,8 e 73,1%; para 15 °C reduções 17,4 e 25,2%; para 20 °C reduções de 0,9 e 2,2%; para 25 °C reduções de 5,3 e 4,2%; para 30 °C reduções de 30,6 e 31,1% e para 35 °C reduções de 76,8 e 83,1%, respectivamente, no primeiro e segundo experimento.

Nos dois experimentos conduzidos (Figuras 1 e 2) a análise de regressão polinomial revelou efeito significativo sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

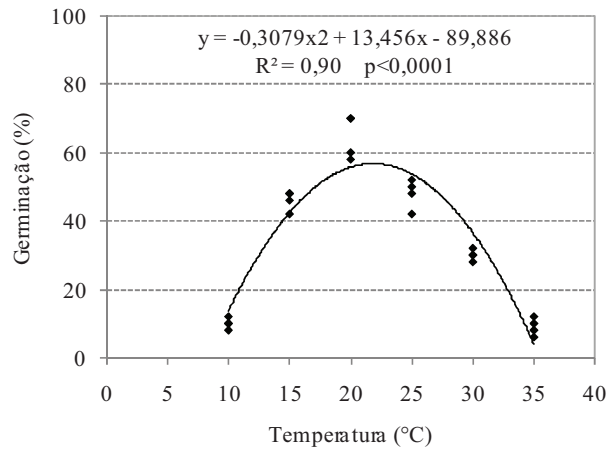
Marchetti et al. (1976), relatam uma faixa de temperatura, para germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, entre 15 e 25 °C. Godoy e Flausino (2004) relatam uma faixa de temperatura entre 18 e 26° C. Alves et al. (2006) através de uma função que estabelece relação entre germinação e temperatura, identificam uma faixa, para germinação de *P. pachyrhizi*, entre 15 e 25 °C. Bonde et al. (2007), para a máxima germinação dos uredosporos, avaliando diferentes isolados, observou uma faixa de temperatura entre 21,8 e 23,4 °C e para comprimento dos tubos germinativos uma faixa ótima entre 21 e 24,4 °C.

Os resultados aqui apresentados, com relação às temperaturas ótimas para germinação e comprimento do tubo germinativo dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, confirmam dados descritos na literatura.

A temperatura ideal para a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, para os dados observados, encontra-se na faixa de 20 a 25 °C e o ponto de máxima estimado foi de 21,8 °C para o primeiro experimento e 22,3 °C para o segundo experimento conduzido.

A temperatura ideal para o crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, para os dados observados, encontra-se na faixa de 20 a 25 °C e o ponto de máximo estimado foi de 21,4 °C para o primeiro experimento e 22,1 °C para o segundo experimento conduzido.

Experimento 1



Experimento 2

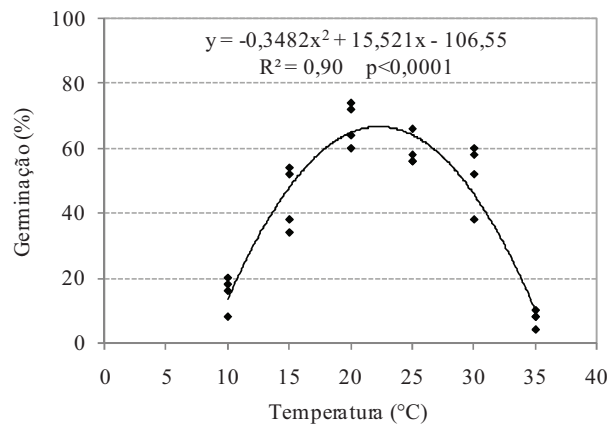
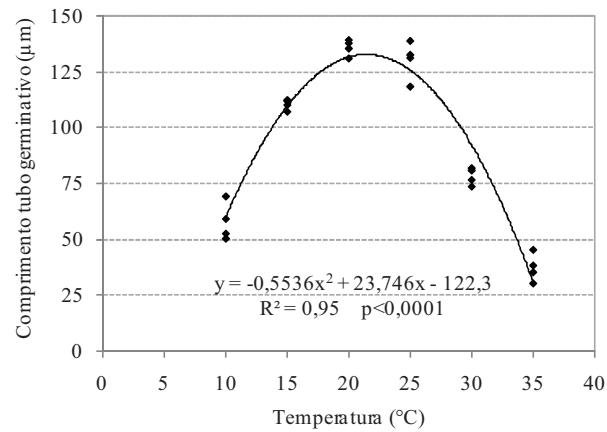


Figura 1. Relação entre a temperatura e a germinação de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (6 h exposição; escuro; ágar-água)

Experimento 1



Experimento 2

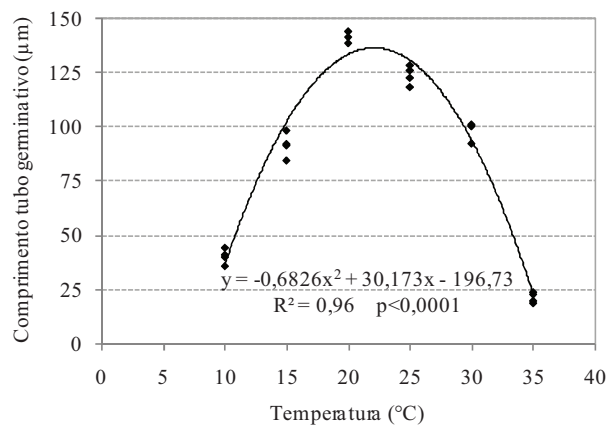


Figura 2. Relação entre a temperatura e o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (6 h exposição; escuro; ágar-água)

3.3 Efeito do tempo de exposição

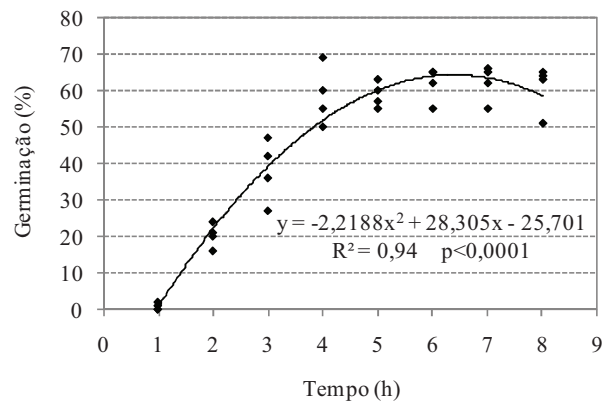
As curvas geradas para avaliar a relação entre a germinação dos uredosporos e os tempos de exposição de quatro até 40 horas (primeiro ensaio) não foram significativas. Avaliando-se os tempos de exposição, no segundo ensaio (uma a oito horas), identificou-se o tempo de 6,4 horas, em ambos os experimentos, para obtenção da germinação máxima dos uredosporos (Figura 3). A partir de 2,5 e 2,3 horas, respectivamente nos dois experimentos, 50% dos uredosporos já se encontravam germinados. Com uma hora 0,4 e 12% e com 4 horas, 52 e 63,5%, já haviam germinado, respectivamente nas duas vezes em que o experimento foi conduzido.

Na avaliação do comprimento dos tubos germinativos, com tempo de até 40 horas, o crescimento máximo, para os dois experimentos, foi observado com 37,7 horas de exposição (Figura 4), sendo estes estimados na ordem de 653 μm e 637 μm , respectivamente. Quando se avaliou o tempo de oito horas de exposição, o crescimento dos tubos germinativos foi linear, sendo que para cada hora de exposição quantificou-se um aumento de 44,3 e 45,2 μm (Figura 5) e um crescimento máximo, referente a oito horas, de 354 e 361,4 μm , respectivamente, para os dois experimentos.

No ensaio conduzido com os tempos de exposição de uma a oito h (Figuras 3 e 5), a análise de regressão polinomial revelou efeito significativo sobre a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* e a regressão linear revelou sobre o comprimento do tubo germinativo. No ensaio conduzido com os tempos de exposição de quatro a 40 h (Figura 4) a análise de regressão polinomial revelou

efeito significativo sobre o comprimento do tubo germinativo dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

Experimento 1



Experimento 2

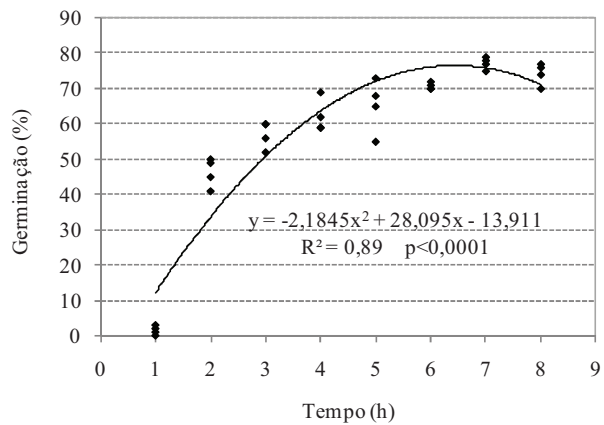
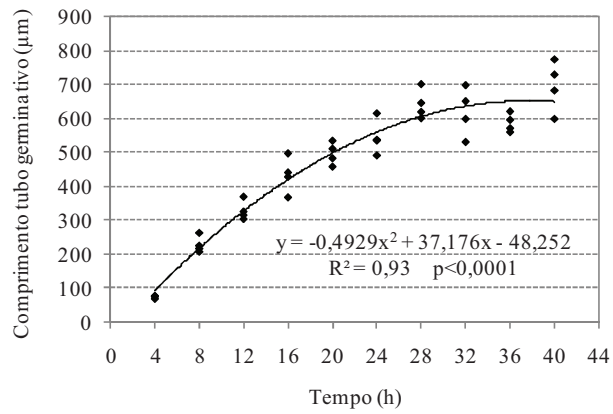


Figura 3. Relação entre o tempo de exposição e a germinação de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (ágar-água; escuro; 22 °C; 1 h a 8 h)

Experimento 1



Experimento 2

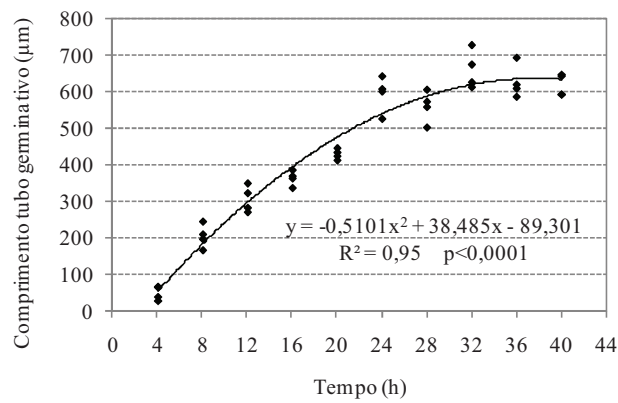
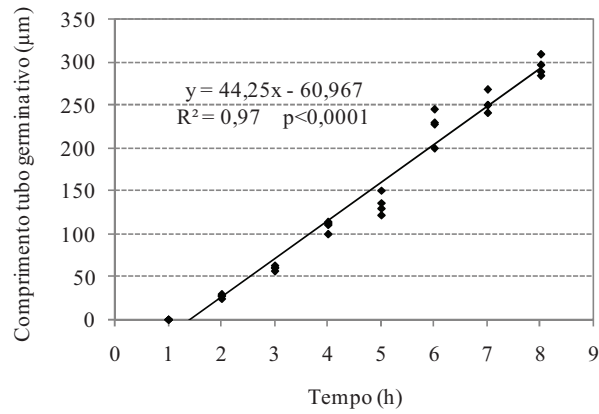


Figura 4. Relação entre o tempo de exposição e o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (ágar-água; escuro; 22 °C; 4 h a 40 h)

Experimento 1



Experimento 2

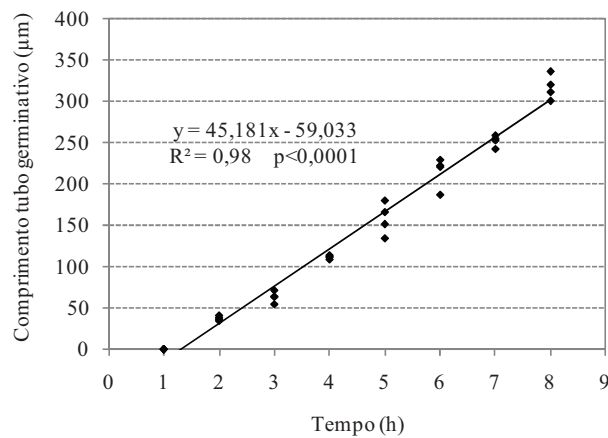


Figura 5. Relação entre o tempo de exposição e o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (ágar-água; escuro; 22 °C; 1 h a 8 h)

Marchetti et al. (1976) quantificando o efeito da temperatura e molhamento foliar sobre a germinação de uredosporos de *P. pachyrhizi*, *in vitro*, avaliam períodos de quatro a 22 horas de incubação (exposição), sendo que não são observadas variações na resposta à temperatura ótima para germinação, mas demonstram, através de um gráfico, que no período de incubação de quatro horas o máximo de germinação recuperada ficou próximo a 25% enquanto que no tempo de incubação de 22 horas a germinação atinge, aproximadamente, 40%, demonstrando que a quatro horas de incubação 62,5% dos uredosporos já haviam germinado. Os resultados obtidos nos experimentos, aqui desenvolvidos, confirmam os obtidos pelo referido autor.

Bonde et al. (1976) relatam início de germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, entre uma e duas horas após inoculação de plantas (incubação em câmara úmida, 20 °C, escuro).

Alves et al. (2004), avaliando o efeito da temperatura e da duração do período de molhamento sobre a germinação de uredosporos de *P. pachyrhizi*, *in vitro*, testando os períodos de incubação de uma, duas, quatro, oito e doze horas, identificaram o período mínimo de uma hora para início da germinação e estabilização do processo a partir de oito horas, confirmando, parcialmente no que se refere ao tempo de exposição, os resultados obtidos neste experimento.

Bonde et al. (2007), avaliando o efeito da temperatura sobre a germinação e comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *P. pachyrhizi*, *in vitro*, testam dois tempos de

incubação (três e seis horas) e não observam diferenças entre os tempos de exposição com relação às temperaturas identificadas.

Zambenedetti Magnani et al. (2007) avaliando germinação de uredosporos *P. pachyrhizi*, sobre folíolos de diferentes cultivares de soja, destacados, relatam que a partir de quatro horas de incubação, em todos os cultivares, os uredosporos já haviam germinado.

3.4 Efeito do fotoperíodo

Com relação ao efeito do fotoperíodo sobre a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* ficou demonstrado que na ausência de luz houve a maior percentagem de germinação (Figuras 6 e 8). Sob luz contínua observaram-se os menores valores de germinação, com reduções na ordem de 91,5 e 97,9%, no ensaio conduzido para avaliar quatro regimes de luz (Figura 6). Em outro ensaio, avaliando-se 12 regimes de luz (Figura 8), no experimento 1, os regimes de luz contínua e 1 h de escuro seguida de 5 h de luz apresentaram os menores e mesmos valores de germinação, com redução na ordem de 83,9%. No experimento 2, a maior redução de germinação ficou no regime de 1 h de escuro seguida de 5 h de luz, com valor referente a 71,8%.

Com relação ao efeito do fotoperíodo sobre o comprimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, para o ensaio que avaliou quatro diferentes regimes de luz (Figura 7), ficou demonstrado que na ausência de luz ocorreram os maiores crescimentos. Avaliando-se 12 regimes de luz (Figura 9), o tratamento ausência de luz não diferiu das combinações 4 h de escuro

seguidas de 2 h de luz; 5 h de escuro seguidas de 1 h de luz e 1 h de luz seguida de 5 h de escuro, proporcionando, desta forma, os maiores crescimentos dos tubos germinativos.

As maiores inibições no crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi* ficaram nos regimes de 1 h de escuro seguida de 5 h de luz (inibição na ordem de 71,1%, no experimento 1) e para o regime de luz contínua (na ordem de 53,4%, no experimento 2) (Figuras 7 e 9).

Bonde et al. (1976) observando a germinação e formação de apressórios em uredosporos de *P. pachyrhizi*, sobre folíolos de soja inoculados, conduziram experimentos com diferentes tempos de incubação (cinco a 16 horas), todos na ausência de luz.

Piza et al. (1988) avaliando o efeito da luz sobre a germinação de uredosporos de *Puccinia psidii* Winter, onde cinco tratamentos foram testados (luz contínua, escuro contínuo, 8, 16 e 20 h de fotoperíodo), observaram maior germinação em escuro contínuo e menor germinação em luz contínua.

Naruzawa et al. (2006) avaliando o efeito da luz (claro e escuro) e da temperatura (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C), sobre a germinação de uredosporos de *Phakopsora euvitis* Ono, observaram que a condição ausência de luz proporcionou as maiores germinações, até a temperatura de 25 °C, e que o regime claro ou escuro foi indiferente para as temperaturas superiores.

Costa et al. (2007) avaliando o efeito da luz (claro e escuro) e da temperatura (10, 15, 20 e 25 °C), sobre a germinação de uredosporos de *Puccinia substriata* Ell. & Barth. var. *penicillariae*

(Speg.), relatam a máxima germinação a 17,5 °C na condição de ausência de luz.

Furtado (2007) relata que, em experimentos conduzidos *in vitro*, na ausência de luz, houve maior germinação e maior formação de apressórios em uredosporos de *P. pachyrhizi*.

Zambenedetti et al. (2007) avaliando o efeito de diferentes métodos de armazenamento na viabilidade de uredosporos de *P. pachyrhizi*, quantificam a germinação após período de incubação de quatro horas, a 25 °C e na ausência de luz.

Soares et al. (2008) avaliando o efeito de glifosato sobre a germinação de uredosporos de *P. pachyrhizi*, *in vitro*, realizam a incubação por cinco horas, a 24 °C e na ausência de luz.

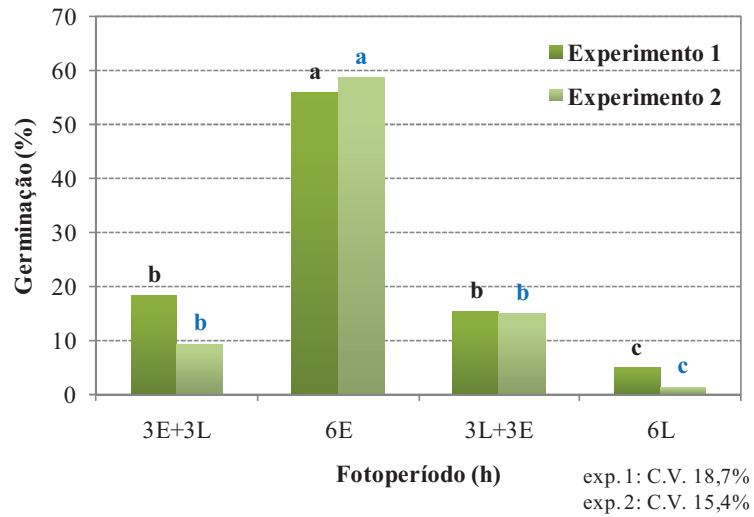


Figura 6. Efeito do fotoperíodo sobre a germinação de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (ágar-água; 22 °C; E=escuro; L=luz; 4 regimes)

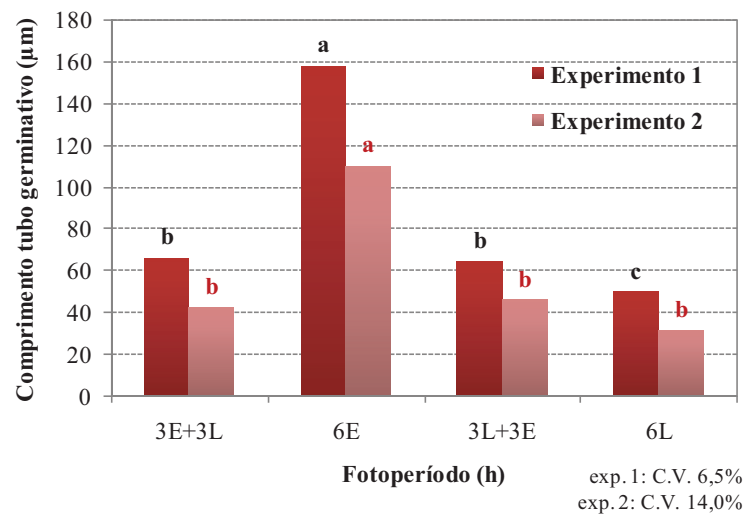


Figura 7. Efeito do fotoperíodo sobre o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (ágar-água; 22 °C; E=escuro; L=luz; 4 regimes)

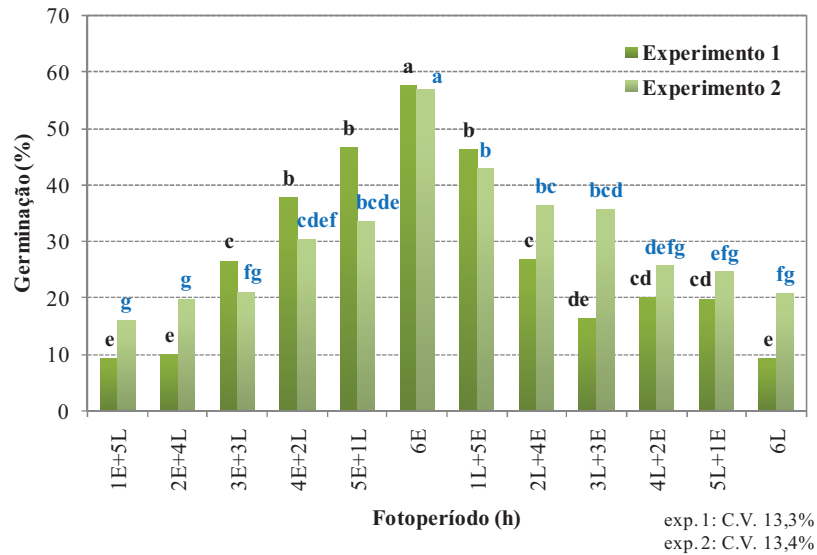


Figura 8. Efeito do fotoperíodo sobre a germinação de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (ágar-água; 22 °C; E=escuro; L=luz; 12 regimes)

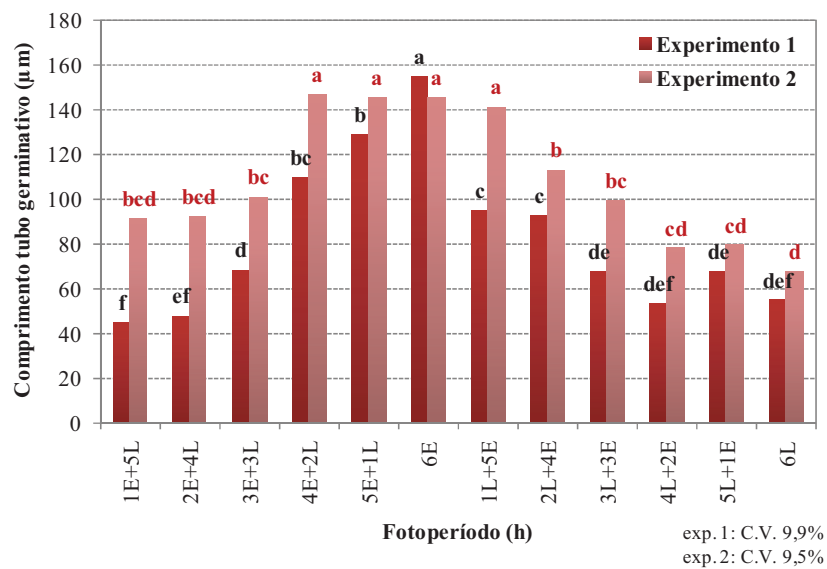


Figura 9. Efeito do fotoperíodo sobre o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* (ágar-água; 22 °C; E=escuro; L=luz; 12 regimes)

4 CONCLUSÕES

A germinação e o comprimento do tubo germinativo dos uredosporos de *P. pachyrhizi* são reduzidos quando, em testes *in vitro*, se utiliza o substrato batata-dextrose-ágar (BDA) a 100%.

A germinação e crescimento dos tubos germinativos máximo dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, para os dados observados, encontram-se dentro da faixa de 20 a 25 °C

As temperaturas extremas testadas (mínima e máxima) não foram suficientes para inibir completamente a germinação e/ou o crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

A temperatura máxima testada, percentualmente, reduziu mais a germinação e o comprimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, que a temperatura mínima testada.

Uma hora de exposição, nas condições em que os ensaios foram conduzidos, já possibilitou a germinação e o crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

Com 6,4 h de tempo de exposição, nas condições em que os ensaios foram conduzidos, se obteve a germinação máxima dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

Até oito horas de exposição, o incremento em germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* segue uma função quadrática e o incremento no comprimento dos tubos germinativos segue uma função linear.

Na ausência de luz são observadas a germinação máxima e o comprimento do tubo germinativo máximo dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

A exposição à luz contínua não inibe, totalmente, a germinação e nem o crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

Nas condições em que os ensaios foram conduzidos, tanto a presença da luz como sua ausência, no primeiro momento de exposição, apresentaram tendências semelhantes com relação às reduções ou incrementos em germinação e crescimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*.

CAPÍTULO II

SENSIBILIDADE DE *Phakopsora pachyrhizi* A FUNGICIDAS *IN VITRO*

MARTA MARIA CASA BLUM¹ E ERLEI MELO REIS²

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo determinar a sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas, *in vitro*, sobre a germinação e sobre o comprimento do tubo germinativo dos uredosporos. Os fungicidas foram incorporados em meio ágar-água, em diferentes concentrações. As CI_{50} s foram determinadas para quatro fungicidas do grupo das estrobilurinas e para sete fungicidas do grupo dos inibidores da desmetilação. Para a variável inibição da germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi*, de um isolado sensível, a CI_{50} para azoxistrobina, respectivamente, na primeira e segunda repetição do experimento, foi de 0,11 e 0,03 mg L⁻¹, para picoxistrobina 0,06 e 0,02 mg L⁻¹, para piraclostrobina 0,01 e 0,14 mg L⁻¹, para trifloxistrobina 0,01 e 0,02 mg L⁻¹, para ciproconazol 2,91 e 3,10 mg L⁻¹, para epoxiconazol 0,42 e 0,47 mg L⁻¹, para flutriafol 5,57 e 5,65 mg L⁻¹, para metconazol 0,09 e 0,79 mg L⁻¹, para miclobutanil 3,16 e 2,98 mg L⁻¹, para tebuconazol 0,008 e 0,005 mg L⁻¹ e para tetraconazol 7,54 e 7,33 mg L⁻¹. Para a variável inibição do comprimento do tubo

¹Engenheira Agrônoma, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia - martablum@gmail.com

²Orientador, Eng. Agr., Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF - erleireis@tpo.com.br

germinativo de *P. pachyrhizi*, a CI_{50} para azoxistrobina foi de 0,01 e 0,03 $mg L^{-1}$, para picoxistrobina 0,009 e 0,001 $mg L^{-1}$, para piraclostrobina 0,004 e 0,006 $mg L^{-1}$, para trifloxistrobina 0,002 e 0,02 $mg L^{-1}$, para ciproconazol 16,83 e 36,08 $mg L^{-1}$, para epoxiconazol não houve ajuste, para flutriafol 12,14 e 11,82 $mg L^{-1}$, para metconazol 3,68 e 3,04 $mg L^{-1}$, para miclobutanil 12,17 $mg L^{-1}$, para tebuconazol 0,04 e 0,06 $mg L^{-1}$ e para tetraconazol 17,33 $mg L^{-1}$.

Palavras chave: fungitoxicidade, estrobilurinas, triazóis, ferrugem asiática da soja.

SENSITIVITY OF *Phakopsora pachyrhizi* TO FUNGICIDES IN VITRO

ABSTRACT – This work aimed to determine the sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* to fungicides, *in vitro*, on the germination and on the uredospores germinative tube length. The fungicides were solubilized in agar-water, in different concentrations. The IC_{50} s were determined to four fungicides from the strobirulins group and seven fungicides from the demethylation inhibitors group. To the uredospores germination inhibition of *P. pachyrhizi*, of an sensitive isolated, the IC_{50} to azoxystrobin, respectively, on the first and second experiment repetition, was of 0.11 and 0.03 mgL^{-1} , to picoxystrobin 0.06 and 0.02 mgL^{-1} , to pyraclostrobin 0.01 and 0.14 mgL^{-1} , to trifloxystrobin 0.01 and 0.02 mgL^{-1} , to cyproconazol 2.91 and 3.10 mgL^{-1} , to epoxiconazole 0.42 and 0.47 mgL^{-1} , to flutriafol 5.57 and 5.65 mgL^{-1} , to metconazol 0.09 and 0.79 mgL^{-1} , to myclobutanil 3.16

and 2.98 mgL⁻¹, to tebuconazol 0.008 and 0.005 mgL⁻¹ and to tetraconazol 7.54 and 7.33 mgL⁻¹. To the germinative tube length inhibition variable of *P. pachyrhizi*, the IC₅₀ to azoxystrobin was of 0.01 and 0.03 mgL⁻¹, to picoxystrobin 0.009 and 0.001 mgL⁻¹, to pyraclostrobin 0.004 and 0.006 mgL⁻¹, to trifloxystrobin 0.002 and 0.02 mgL⁻¹, to cyproconazol 16.83 and 36.08 mgL⁻¹, to epoxiconazol there was no adjust, to flutriafol 12.14 and 11.82 mgL⁻¹, to metconazol 3.68 and 3.04 mgL⁻¹, to myclobutanil 12.17 mgL⁻¹, to tebuconazol 0.04 and 0.06 mgL⁻¹ and to tetraconazol 17.33 mgL⁻¹.

Key-words: fungitoxicity, strobilurins, triazoles, asian soybean rust.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd., embora não se constitua na única medida de controle para esta doença, tem sido a prática mais eficiente, até o momento, no manejo de epidemias, auxiliando, portanto, na manutenção das produtividades na cultura da soja, reduzindo perdas e promovendo a sustentabilidade da atividade agrícola.

A aplicação de fungicidas em pulverização da parte aérea da cultura da soja, tendo como alvo a ferrugem asiática, tem sido a preconizada (REUNIÃO, 2008; TECNOLOGIAS, 2008). Estão registradas, até esta data, 54 formulações comerciais de fungicidas, no Brasil (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009).

Os ingredientes ativos dos fungicidas registrados para o controle da ferrugem asiática da soja pertencem, na sua maioria, a dois grupos químicos, orgânicos: estrobilurinas e triazóis.

Quanto ao mecanismo geral de ação, ou modo de ação ou, ainda, modo bioquímico de ação, do fungicida sobre as células dos fungos, os fungicidas estrobilurinas ou IQe (inibidores da quinona externa) se caracterizam por interferir no processo de respiração mitocondrial (bloqueando a transferência de elétrons entre os citocromos *b* e *c1*, impedindo liberação de energia e a formação de ATP) e os fungicidas triazóis ou inibidores da desmetilação (IDMs) se caracterizam por interferir na biossíntese do esteroide na membrana

celular (atuando na desmetilação do lanosterol, na posição do C-14, na rota de biossíntese do ergosterol) (FORCELINI et. al, 2001; 1994; REIS et al., 2007a; FRAC, 2009).

Os ingredientes ativos dos fungicidas (isolados e/ou em mistura) do grupo das estrobilurinas, registrados, até esta data, para o controle da ferrugem asiática da soja, no Brasil, são: azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina. Os fungicidas do grupo dos triazóis, registrados, até esta data, são: ciproconazol, difenoconazol, epoxiconazol, fluquinconazol, flutriafol, metconazol, miclobutanil, propiconazol, protioconazol, tebuconazol e tetraconazol (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009).

A fungitoxicidade é uma propriedade inerente a uma substância química e se caracteriza pela toxicidade aos fungos em baixas concentrações (REIS et al., 2007). A toxicidade é a capacidade que uma substância química apresenta de produzir um efeito nocivo sobre um sistema biológico, em determinada condição de exposição (OGA et al., 2008).

Uma substância química em função de suas características, inerentes à molécula química, apresenta fungitoxicidade. Um fungo, por sua vez, em função de suas características genéticas apresenta, ou não, sensibilidade a uma dada molécula. Se um fungo for sensível a um fungicida, este apresenta fungitoxicidade; em caso contrário, é atóxico. Se o fungicida não apresenta fungitoxicidade, o fungo é, então, considerado insensível (REIS et al., 2007).

Ensaios *in vitro*, para determinação da fungitoxicidade de uma substância, podem ser direcionados para patógenos biotróficos,

contudo, na maioria das vezes, limitam-se à avaliação da germinação dos esporos, à mensuração do tubo germinativo ou à morfologia do tubo germinativo (GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004; BUZZERIO, 2007).

Parâmetros como a DE_{50} (dose efetiva ou eficaz que promove um efeito desejado em 50% dos microrganismos submetidos ao teste), DL_{50} (dose letal), CL_{50} (concentração letal), CI_{50} (concentração inibitória), CE_{50} (concentração efetiva), IC_{50} (inibição do crescimento) ou CMI (concentração mínima inibitória) definem a fungitoxicidade de uma substância química (SHARVELLE 1961; TORGESON, 1967; EDGINGTON et. al., 1971; LOOMIS, 1995; RUSSEL, 2004; SILVA, 2006; OGA et al., 2008).

Valores de CI_{50} s, para diferentes fungicidas e específicos a *P. pachyrhizi*, obtidos em testes *in vitro*, são escassos na literatura, contudo muito úteis na condução de trabalhos de pesquisa e monitoramento de sensibilidade, principalmente em regiões onde a demanda pelo uso de fungicidas na cultura é intensa. Portanto, objetivou-se com este trabalho a determinação da fungitoxicidade de alguns fungicidas a *P. pachyrhizi*, *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio para quantificação da sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas, *in vitro*, foi conduzido no laboratório de Fitopatologia (Micologia) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo - UPF (Passo

Fundo/RS), no ano de 2007. Para cada fungicida testado, o ensaio foi conduzido duas vezes (Experimentos 1 e 2).

O inóculo da ferrugem da soja utilizado nos experimentos foi proveniente de uma amostra da população de uredosporos, obtida de plantas naturalmente infectadas, na safra de 2004/05, no campo experimental da FAMV-UPF. Este foi mantido e multiplicado em vasos contendo plantas de soja (sobre o cultivar BRS 154 nos anos de 2005 e 2006 e, após, sobre o cultivar CD 219 RR, em função da sua menor suscetibilidade ao oídio - *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takamatsu), num ambiente parcialmente controlado (22 ± 2 °C e 14 horas de fotoperíodo) e sem exposição a nenhum tipo de fungicida, desde março de 2005. Esta amostra da população de uredosporos, que deu origem ao inóculo utilizado nos experimentos, será aqui designada como “isolado sensível”.

Os uredosporos de *P. pachyrhizi*, utilizados nos experimentos, foram removidos das folhas de soja por agitação, manual, dentro de um recipiente fechado (erlenmeyer), contendo água destilada com duas gotas L⁻¹ do surfactante Tween 20 (marca registrada).

Para a determinação da fungitoxicidade a *P. pachyrhizi*, os ingredientes ativos testados foram azoxistrobina, picoxistrobina, piraclastrobina, trifloxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol, metconazol, miclobutanil, tebuconazol e tetraconazol, utilizando-se as seguintes formulações comerciais (fungicidas isolados): Priori 250 SC (azoxistrobina), Aproach 250 SC (picoxistrobina), Comet 250 CE (piraclostrobina), Twist 125 CE (trifloxistrobina), Alto 100 CE (ciproconazol), Opus 125 SC (epoxiconazol), Impact 125 SC

(flutriafol), Caramba 90 CE (metconazol), Systhane 250 CE (miclobutanil), Folicur 200 CE (tebuconazol) e Domark 100 CE (tetraconazol).

Os fungicidas foram diluídos em água destilada e esterilizada e adicionados ao substrato ágar-água (fundente) após a esterilização, com temperatura em torno de 45 °C, obtendo-se, desta forma, distintas concentrações finais. Em seguida, o meio de cultura, contendo as diferentes concentrações fungicidas, foi vertido nas placas de Petri (10 mL por placa) e, após a solidificação, mantido em refrigeração (4 °C) por 24 h, até a condução dos trabalhos de incubação. Utilizaram-se placas de Petri de tamanho 60 x 15 mm (esterilizadas e descartáveis).

As concentrações finais testadas variaram para os diferentes princípios ativos, conforme: azoxistrobina (0; 0,005; 0,05; 0,5 e 5 mg L⁻¹), picoxistrobina (0; 0,001; 0,05; 0,1 e 5 mg L⁻¹), piraclostrobina (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 5 mg L⁻¹), trifloxistrobina (0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg L⁻¹), ciproconazol (0; 0,5; 2,5; 5; 10 e 20 mg L⁻¹), epoxiconazol (0; 0,005; 0,05; 0,5; 2,5 e 5 mg L⁻¹), flutriafol (0; 0,05; 0,5; 5 e 25 mg L⁻¹), metconazol (0; 0,005; 0,05; 0,5; 2,5 e 5 mg L⁻¹), miclobutanil (0; 0,5; 1; 2; 4 e 8 mg L⁻¹), tebuconazol (0; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05 e 0,5 mg L⁻¹) e tetraconazol (0; 2; 4; 5; 10; 20 e 40 mg L⁻¹), na primeira vez em que foi realizado o experimento.

Quando o ensaio foi repetido (Experimento 2), algumas concentrações foram ajustadas, conforme: azoxistrobina (0; 0,005; 0,05; 0,5; 5 e 50 mg L⁻¹), picoxistrobina (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg L⁻¹), piraclostrobina (0; 0,005; 0,05; 0,5; 5 e 25 mg L⁻¹),

trifloxistrobina (0; 0,005; 0,05; 0,5; 5 e 50 mg L⁻¹), ciproconazol (0; 0,5; 5; 10 e 50 mg L⁻¹), epoxiconazol (0; 0,005; 0,05; 0,5; 5 e 50 mg L⁻¹), flutriafol (0; 0,05; 0,5; 5; 25 e 50 mg L⁻¹), metconazol (0; 0,005; 0,05; 0,5; 5 e 25 mg L⁻¹), miclobutanil (0; 5; 10; 15 e 20 mg L⁻¹), tebuconazol (0; 0,005; 0,05; 0,5 e 5 mg L⁻¹) e tetraconazol (0; 2; 4; 5; 10; 20 e 40 mg L⁻¹).

A suspensão de uredosporos utilizada foi ajustada para 2 x 10³ uredosporos mL⁻¹, sendo depositado um mL desta suspensão, sobre o substrato contendo o fungicida, por placa de Petri.

A incubação foi conduzida em câmara incubadora tipo DBO (Demanda Biológica de Oxigênio), com controle de temperatura e fotoperíodo, obedecendo-se a temperatura de 22 °C, o tempo de exposição de seis horas e na ausência de luz. Decorrido o tempo previsto para incubação, a germinação e o crescimento dos tubos germinativos foram interrompidos adicionando-se 0,3 mL de uma solução de acetona (100%) com algumas gotas de corante azul de algodão, em cada placa de Petri. Após as placas foram mantidas em refrigerador (4 °C), para posterior avaliação.

Foram quantificadas a germinação e o comprimento do tubo germinativo dos uredosporos de *P. pachyrhizi*. A unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento. Para a variável germinação, foram observados 100 uredosporos e para o comprimento do tubo germinativo foram mensurados 50 uredosporos, por repetição. O uredosporo foi considerado germinado quando apresentou tubo germinativo de comprimento maior ou igual ao menor diâmetro do esporo. A quantificação da germinação e a mensuração do

comprimento dos tubos germinativos foram realizadas com o auxílio de microscópio ótico (Olympus CX41) (com retículo micrométrico adaptado à ocular), através de varredura da placa de Petri.

A fungitoxicidade para os diferentes fungicidas, representada pela CI_{50} , foi estimada para as variáveis germinação e comprimento dos tubos germinativos dos uredosporos de *P. pachyrhizi*. Os dados foram expressos em percentagem de inibição da germinação e do comprimento do tubo germinativo, em relação à testemunha sem a presença do fungicida no meio de cultura. Os valores de CI_{50} , para a germinação e para o comprimento do tubo germinativo, de cada ingrediente ativo, foram estimados por meio do procedimento Probit utilizando-se o software estatístico SAS, versão 8.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fungitoxicidade dos diferentes fungicidas, para as duas vezes em que o ensaio foi realizado, *in vitro*, sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de uredosporos de *P. pachyrhizi* encontra-se representada nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, assim como, nas Figuras 1 e 2, inclusas nos Apêndices A até K, através da percentagem de inibição da germinação e da percentagem de inibição do comprimento do tubo germinativo.

As concentrações inibitórias (CI_{50} s) para reduzir em 50% a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* para os fungicidas estrobilurinas ficaram distribuídas num intervalo entre 0,01 e 0,16

mg L⁻¹ para azoxistrobina; 0,01 e 0,07 mg L⁻¹ para picoxistrobina; 0,004 e 0,3 mg L⁻¹ para piraclostrobina e entre 0,007 e 0,03 mg L⁻¹ para trifloxistrobina (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória (mg L⁻¹) de fungicidas estrobilurinas para reduzir em 50% a germinação dos uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz)

Fungicida		CI ₅₀ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (95%)	Erro
Azoxistrobina	Experimento 1	0,11*	0,07 - 0,16	0,27
	Experimento 2	0,03	0,01 - 0,05	0,23
Picoxistrobina	Experimento 1	0,06	0,04 - 0,07	0,73
	Experimento 2	0,02	0,01 - 0,04	0,25
Piraclostrobina	Experimento 1	0,01	0,004 - 0,02	0,45
	Experimento 2	0,14	0,04 - 0,30	0,14
Trifloxistrobina	Experimento 1	0,01	0,007 - 0,02	0,25
	Experimento 2	0,02	0,01 - 0,03	0,25

* Valores estimados pelo procedimento Probit

Para reduzir em 50% o comprimento do tubo germinativo, as concentrações inibitórias ficaram na faixa entre 0,004 e 0,05 mg L⁻¹ azoxistrobina; 0,0005 e 0,019 mg L⁻¹ para picoxistrobina; 0,001 e 0,02 mg L⁻¹ para piraclostrobina e entre 0,0005 e 0,042 mg L⁻¹ para trifloxistrobina (Tabela 2).

Pode-se observar que, para os fungicidas estrobilurinas, à exceção de um valor estimado para azoxistrobina (Experimento 2) (Tabela 2), os outros valores estimados de CI₅₀ foram mais baixos quando da avaliação do comprimento do tubo germinativo em relação

à percentagem de germinação dos uredosporos sugerindo-se, desta forma, uma maior sensibilidade no teste para aquela variável.

Tabela 2. Concentração inibitória (mg L^{-1}) de fungicidas estrobilurinas para inibir em 50% o crescimento do tubo germinativo dos uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz)

Fungicida		CI ₅₀ (mg L^{-1})	Intervalo de confiança (95%)	Erro
Azoxistrobina	Experimento 1	0,01*	0,004 - 0,02	0,13
	Experimento 2	0,03	0,01 - 0,05	0,11
Picoxistrobina	Experimento 1	0,009	0,004 - 0,019	0,15
	Experimento 2	0,001	0,0005 - 0,002	0,13
Piraclostrobina	Experimento 1	0,004	0,002 - 0,006	0,22
	Experimento 2	0,006	0,001 - 0,020	0,13
Trifloxistrobina	Experimento 1	0,002	0,0005 - 0,004	0,18
	Experimento 2	0,02	0,009 - 0,042	0,20

* Valores estimados pelo procedimento Probit

Buzzerio (2007), utilizando a mesma metodologia, *in vitro*, em monitoramento da sensibilidade de *P. pachyrhizi* a azoxistrobina, descreve valores de concentrações letais para germinação de uredosporos (entretanto, para 90% de redução da população em teste - CL₉₀), na safra de cultivo da soja no Brasil 2005/06, numa faixa entre 0,0103 a 0,4945 mg L^{-1} e na safra de 2006/07 valores numa faixa entre 0,0861 e 0,5065 mg L^{-1} .

As concentrações inibitórias para reduzir em 50% a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* para os fungicidas triazóis ficaram distribuídas num intervalo entre 1,64 e 4,48 mg L^{-1} para ciproconazol; 0,12 e 0,92 mg L^{-1} para epoxiconazol; 3,64 e 7,53

mg L⁻¹ para flutriafol; 0,03 e 1,15 mg L⁻¹ para metconazol; 1,65 e 4,02 mg L⁻¹ para miclobutanil; 0,002 e 0,01 mg L⁻¹ para tebuconazol e entre 2,65 e 17,63 mg L⁻¹ para tetraconazol (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória (mg L⁻¹) de fungicidas triazóis para reduzir em 50% a germinação dos uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz)

Fungicida		CI ₅₀ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (95%)	Erro
Ciproconazol	Experimento 1	2,91*	1,64 - 4,20	0,23
	Experimento 2	3,10	1,71 - 4,48	0,29
Epoxiconazol	Experimento 1	0,42	0,12 - 0,74	0,26
	Experimento 2	0,47	0,16 - 0,92	0,24
Flutriafol	Experimento 1	5,57	4,04 - 7,12	0,57
	Experimento 2	5,65	3,64 - 7,53	0,49
Metconazol	Experimento 1	0,09	0,03 - 0,16	0,24
	Experimento 2	0,79	0,48 - 1,15	0,18
Miclobutanil	Experimento 1	3,16	2,39 - 3,79	0,37
	Experimento 2	2,98	1,65 - 4,02	0,50
Tebuconazol	Experimento 1	0,008	0,006 - 0,010	0,48
	Experimento 2	0,005	0,002 - 0,009	0,28
Tetraconazol	Experimento 1	7,54	5,91 - 9,11	0,38
	Experimento 2	7,33	2,65 - 17,63	0,13

* Valores estimados pelo procedimento Probit

Para reduzir em 50% o comprimento do tubo germinativo, as concentrações inibitórias ficaram na faixa entre 13,64 e 387,04 mg L⁻¹ para ciproconazol; 7,31 e 35,47 mg L⁻¹ para flutriafol; 1,14 e 75,10 mg L⁻¹ para metconazol; 2,39 e 3,79 mg L⁻¹ para miclobutanil;

0,03 e 0,10 mg L⁻¹ para tebuconazol e entre 12,31 e 28,67 mg L⁻¹ para tetraconazol (Tabela 4).

Com relação à variável crescimento do tubo germinativo, não se obteve ajuste estatístico, para os valores observados, nas duas vezes em que se realizou o ensaio com o fungicida epoxiconazol e, na segunda vez em que o ensaio foi conduzido com os fungicidas miclobutanil e tetraconazol.

Tabela 4. Concentração inibitória (mg L⁻¹) de fungicidas triazóis para inibir em 50% o crescimento do tubo germinativo dos uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz)

Fungicida		CI ₅₀ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (95%)	Erro
Ciproconazol	Experimento 1	16,83*	13,64 - 22,39	0,47
	Experimento 2	36,08	17,15 - 387,04	0,27
Flutriafol	Experimento 1	12,14	7,91 - 35,47	0,56
	Experimento 2	11,82	7,31 - 29,72	0,39
Metconazol	Experimento 1	3,68	2,16 - 75,10	0,22
	Experimento 2	3,04	1,14 - 5,57	0,44
Miclobutanil	Experimento 1	12,17	2,39 - 3,79	0,46
Tebuconazol	Experimento 1	0,04	0,03 - 0,04	1,22
	Experimento 2	0,06	0,04 - 0,10	0,14
Tetraconazol	Experimento 1	17,33	12,31 - 28,67	0,25

* Valores estimados pelo procedimento Probit

Contrariamente aos resultados obtidos para os fungicidas do grupo das estrobilurinas, os valores de CI₅₀, estimados para a variável crescimento do tubo germinativo, para os fungicidas triazóis (Tabela

4), foram superiores àqueles estimados para a variável germinação dos uredosporos.

Junqueira (1982), em trabalhos sobre controle químico da ferrugem da soja, determinou valores de DE_{50} s, *in vitro* (germinação de uredosporos; ágar-água + fungicida), para os fungicidas benomil ($78,7 \text{ mg L}^{-1}$), triadimefon ($57,2 \text{ mg L}^{-1}$), triforine ($31,5 \text{ mg L}^{-1}$), oxiclreto de cobre $258,0 \text{ mg L}^{-1}$), clorotalonil ($10,5 \text{ mg L}^{-1}$) e maneb ($8,7 \text{ mg L}^{-1}$). As DE_{50} s também foram determinadas *in vivo*.

Silva e Souza (2005), avaliando a sensibilidade *in vitro* de *P. pachyrhizi*, através da inibição da germinação dos uredosporos, aos fungicidas tiofanato metílico, metominostrobin, clorotalonil e uma mistura de tiofanato metílico + flutriafol, relatam diferentes percentagens de controle, contudo, não definem concentrações inibitórias.

Testes para a avaliação da sensibilidade de patógenos a fungicidas, *in vitro*, frequentemente se baseiam na mensuração do crescimento miceliano de um fungo, que se desenvolve em um meio específico de cultura, contendo diferentes concentrações de um fungicida. Contudo estes testes, normalmente, não podem ser utilizados para patógenos obrigatórios ou mesmo para patógenos não obrigatórios, onde seu crescimento em meio de cultivo é muito lento. Logo, a avaliação da germinação de esporos tem sido uma alternativa para estes testes, principalmente, de avaliação de sensibilidade ou monitoramento de redução de sensibilidade.

Para alguns autores, esta metodologia de germinação de esporos apresenta limitações, principalmente, no que diz respeito a sua correlação com respostas obtidas com o crescimento da colônia do

fungo em meio de cultura ou ainda, para aqueles onde não há esta possibilidade, sua correlação com testes realizados *in vivo*. Outra limitação para esta metodologia estaria relacionada ao fungicida, mais especificamente, se no momento da germinação do esporo, o alvo do fungicida estaria ativo (PONTZEN & SCHEIPFLUG, 1989), como, por exemplo, os inibidores da desmetilação.

Clarkson et al. (1997), quantificando o efeito do propiconazol sobre a germinação de uredosporos *Puccinia allii* Rud., *in vitro*, num período de exposição ao fungicida de 24 h, relatam que nas concentrações de 0,1 e 0,075 mg L⁻¹ a germinação foi 100% inibida.

Buck e Williams-Woodward (2003), avaliando a eficácia de sete fungicidas *in vitro*, sobre *Puccinia hemerocallidis* Thümen, entre eles miclobutanil e propiconazol, não observaram redução na germinação dos uredosporos, para esses fungicidas nas concentrações testadas, e sugerem a possibilidade do uso de reservas do ergosterol durante o processo de germinação, comprometendo desta forma a resposta observada em testes *in vitro*. O tempo de exposição dos uredosporos aos fungicidas, no teste, foi de 24 h.

Mueller et al. (2005) avaliando a fungitoxicidade de 12 diferentes fungicidas a uredosporos de seis espécies de ferrugens (*P. hemerocallidis*, *Puccinia iridis* (DC.) Wallr., *Puccinia menthae* Pers., *Puccinia oxalidis* (Lev.) Dietel e Ellis, *Puccinia pelargonii-zonalis* Doidge e *Pucciniastrum vaccinii* (G. Wint.) Jorst.), relatam elevada redução na germinação dos uredosporos. Na maioria das situações, mais de 80% de controle, quando os uredosporos das diferentes espécies foram expostos, por 24 h, aos fungicidas miclobutanil,

propiconazol, triadimefon e triflumizol. Contudo, os autores, após este tempo de exposição dos uredosporos ao fungicida, removem-nos do meio de cultivo em que se encontravam, submetem-os a uma remoção do fungicida a eles aderido, através de sucessivas lavagens e, após, os submetem a outro período de exposição (18 h) para nova germinação. A partir deste momento, constatam que não houve total letalidade dos fungicidas triazóis sobre os uredosporos não germinados na primeira exposição aos fungicidas, sugerindo, então, uma ação fungistática para os fungicidas avaliados.

Ferreira et al. (2006) avaliando a eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* Viegas em eucalipto (*Eucalyptus* spp.), testaram *in vitro*, entre outros, epoxiconazol, triadimenol, tebuconazol e tetraconazol. Para a germinação dos conídios, o fungo foi altamente sensível ($CE_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$) aos fungicidas epoxiconazol e tebuconazol; tetraconazol foi moderadamente eficaz (CE_{50} entre 1 e 10 mg L^{-1}) e triadimenol não inibiu a germinação. O tempo de exposição dos conídios ao fungicida, no teste, foi de 18 h.

Silva et al. (2006) avaliando a fungitoxicidade de flutriafol, mectonazol, tebuconazol e tetraconazol, entre outros fungicidas, sobre esporos de *Myrothecium roridum* Tode ex Fr. (mancha-de-mirotécio no algodoeiro - *Gossypium arboreum* L.), *in vitro*, relatam que estes fungicidas são eficazes (ED_{50} entre 1 e 10 mg L^{-1} - tetraconazol) ou altamente eficazes ($ED_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ - flutriafol, mectonazol e tebuconazol) sobre a germinação conidial. O tempo de exposição dos esporos ao fungicida, no teste, foi de 22 h.

Pontzen e Scheipflug (1989) avaliando o efeito de fungicidas triazóis (bitertanol, tebuconazol e triadimenol) sobre a síntese do ergosterol, na germinação de esporos de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries., *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. e de *Puccinia graminis* Pers.:Pers. f. sp. *tritici* Eriks. E. Henn, questionam a utilização de testes de sensibilidade *in vitro*, sobre a germinação de uredosporos de *P. graminis* f. sp. *tritici*. Uredosporos de *P. graminis* f. sp. *tritici* não foram capazes de sintetizar o ergosterol até as primeiras duas horas após a indução da germinação, enquanto os tubos germinativos ainda não haviam surgido, e nem até 6 a 8 horas após o início da germinação dos uredosporos (o ergosterol somente foi sintetizado após o desenvolvimento completo do tubo germinativo). Logo, os autores, sugerem que, para *P. graminis* f. sp. *tritici*, testes de fungitoxicidade, avaliando a germinação de uredosporos, não sejam utilizados. Contudo, não descartam a possibilidade do uso destes testes quando, para o patógeno alvo, ficar comprovada que a inibição da síntese do ergosterol esteja, intimamente, relacionada com a inibição do comprimento do tubo germinativo, como ficou demonstrado para *B. cinerea* e *V. inaequalis*.

Para os uredosporos de *P. pachyrhizi*, dados com relação ao momento do início da síntese do ergosterol, durante o período de germinação ou durante o período de alongação do tubo germinativo, ainda, não foram relatados.

Os ensaios conduzidos neste trabalho com *P. pachyrhizi*, tanto para a germinação como para o comprimento do tubo germinativo, para todos os fungicidas triazóis testados (formulações comerciais), permitiram que pudessem ser geradas as CI₅₀s, após 6

horas de exposição dos uredosporos aos fungicidas. As figuras 1 e 2, dos anexos A a K, demonstram as percentagens de inibição, em função dos aumentos crescentes das concentrações, para as duas variáveis quantificadas. Essas percentagens de inibição variaram em função de cada fungicida testado, contudo, seguiram uma mesma tendência. Pôde-se, inclusive, observar, em função das concentrações testadas, que fungicidas como miclobutanil e tebuconazol tiveram 100% de inibição da germinação dos uredosporos, em apenas 6 horas de exposição, o que não ficou distante para os fungicidas miclobutanil e flutriafol com 99,1% de inibição da germinação, tetraconazol com 99,0%, ciproconazol com 98,1% e epoxiconazol com 98,0%, provavelmente, não chegando a 100% da inibição em função das concentrações máximas escolhidas para teste.

Em face do que foi demonstrado, nos experimentos aqui conduzidos, levantam-se as seguintes hipóteses:

- a) *P. pachyrhizi* sintetiza ergosterol nas primeiras 6 horas após o início da exposição dos uredosporos ao fungicida, *in vitro*;
- b) O mecanismo de ação dos ingredientes ativos triazóis, aqui testados, nas primeiras 6 horas após o início da exposição, sobre os uredosporos de *P. pachyrhizi*, *in vitro*, não está sendo na síntese do ergosterol;
- c) Os componentes das formulações, presentes nos fungicidas comerciais aqui testados (Alto 100 CE - ciproconazol; Opus 125 SC - epoxiconazol; Impact 125 SC - flutriafol; Caramba 90 CE - metconazol; Systhane 250 CE - miclobutanil; Folicur 200 CE - tebuconazol e Domark 100 CE - tetraconazol), apresentam ação fungicida ou fungistática sobre uredosporos

de *P. pachyrhizi*, em testes de fungitoxicidade, *in vitro*, nas primeiras 6 horas após o início da exposição.

4 CONCLUSÕES

Os valores de CI_{50s} , determinados neste trabalho, podem ser utilizados como referência para condução de trabalhos de sensibilidade de *P. pachyrhizi*, *in vitro*, aos fungicidas azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobrina, trifloxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol, metconazol, miclobutanil, tebuconazol e tetraconazol, na cultura da soja.

Com relação aos valores de CI_{50s} , obtidos neste trabalho, se observou um comportamento diferenciado para os grupos químicos de fungicidas (IDMs e IQes) testados. Uma maior amplitude de valores foi constatada dentro do grupo dos IDMs .

Valores de CI_{50s} para a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* foram superiores aos valores de CI_{50s} para o comprimento do tubo germinativo, para os fungicidas do grupo das estrobilurinas.

Valores de CI_{50s} para a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* foram inferiores aos valores de CI_{50s} para o comprimento do tubo germinativo, para os fungicidas do grupo dos triazóis.

A possibilidade de quantificação do efeito de fungicidas, *in vitro*, sobre *P. pachyrhizi*, possibilita respostas num prazo curto de tempo (menos de 24 h), associada à redução de custos.

CAPÍTULO III

SENSIBILIDADE DE *Phakopsora pachyrhizi* A FUNGICIDAS *IN VIVO*

MARTA MARIA CASA BLUM¹ E ERLEI MELO REIS²

RESUMO - Ensaios para determinar a sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas, *in vivo*, foram conduzidos utilizando-se a metodologia de folíolos de soja destacados. Foram determinadas as CI₅₀s para quatro fungicidas do grupo das estrobilurinas e sete do grupo dos inibidores da desmetilação. Para o número de lesões de *P. pachyrhizi*, isolado sensível, por cm², a CI₅₀ para azoxistrobina, respectivamente, na primeira e segunda repetição do experimento, foi de 0,127 e 0,093 mg L⁻¹, para picoxistrobina 0,129 e 0,133 mg L⁻¹, para piraclostrobina 0,202 e 0,181 mg L⁻¹, para trifloxistrobina 0,131 e 0,104 mg L⁻¹, para ciproconazol 1,25 e 3,06 mg L⁻¹, para epoxiconazol 0,50 e 1,23 mg L⁻¹, para flutriafol 16,43 e 18,01 mg L⁻¹, para metconazol 2,50 mg L⁻¹, para miclobutanil 19,50 e 15,87 mg L⁻¹, para tebuconazol 0,41 e 0,81 mg L⁻¹ e para tetraconazol 3,82 e 3,17 mg L⁻¹. Para o número de pústulas de *P. pachyrhizi* por cm², a CI₅₀ para azoxistrobina foi de 0,150 e 0,076 mg L⁻¹, para picoxistrobina 0,117 e 0,107 mg L⁻¹, para piraclostrobina 0,108 e 0,135 mg L⁻¹, para

¹Engenheira Agrônoma, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia - martablum@gmail.com

²Orientador, Eng. Agr., Dr., professor da FAMV/PPGAgro/UPF - erleireis@tpo.com.br

trifloxistrobina 0,134 e 0,097 mg L⁻¹, para ciproconazol 0,89 mg L⁻¹, para epoxiconazol 0,31 e 0,61 mg L⁻¹, para flutriafol 15,35 e 11,21 mg L⁻¹, para metconazol 2,61 mg L⁻¹, para miclobutanil 18,28 e 14,03 mg L⁻¹, para tebuconazol 0,32 e 0,77 mg L⁻¹ e para tetraconazol 3,53 e 3,96 mg L⁻¹. Os valores de CI₅₀s, determinados neste trabalho, podem ser utilizados como fator de referência para condução de trabalhos futuros de monitoramento da sensibilidade de *P. pachyrhizi* a essas fungicidas.

Palavras chave: fungitoxicidade, estrobilurinas, triazóis, ferrugem asiática da soja.

SENSITIVITY OF *Phakopsora pachyrhizi* TO FUNGICIDES IN VIVO

ABSTRACT - Trials to determine the sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* to fungicides, *in vivo*, were conducted utilizing soybean deattached leaves methodology. The IC₅₀s were determined to four strobilurins group fungicides and seven demethylation inhibitors group fungicides,. To the number of lesions of *P. pachyrhizi*, sensitive isolated, per cm², the IC₅₀ to azoxystrobin, respectively, in the first and second repetition of the experiment, was of 0.127 and 0.093 mgL⁻¹, to picoxystrobin 0.129 and 0.133 mgL⁻¹, to pyraclostrobin 0.202 and 0.191 mgL⁻¹, to trifloxystrobin 0.131 and 0.104 mgL⁻¹, to cyproconazol 1.25 and 3.06 mgL⁻¹, to epoxiconazol 0.50 and 1.23 mgL⁻¹, to flutriafol 16.43 and 18.01 mgL⁻¹, to metconazol 2.50 mgL⁻¹, to myclobutanil 19.50 and 15.87 mgL⁻¹, to tebuconazol 0.41 and 0.81

mgL⁻¹ and to tetraconazol 3.82 and 3.17 mgL⁻¹. To the number of pustules of *P. pachyrhizi* per cm², the IC₅₀ to azoxystrobin was of 0.150 and 0.076 mgL⁻¹, to pycoxistrobin 0.117 and 0.107 mgL⁻¹, to pyraclostrobin 0.108 and 0.135 mgL⁻¹, to trifloxystrobin 0,134 and 0.097 mgL⁻¹, to cyproconazol 0.89 mgL⁻¹, to epoxiconazol 0.31 and 0.61 mgL⁻¹, to flutriafol 15.35 and 11.21 mgL⁻¹, to metconazol 2.61 mgL⁻¹, to myclobutanil 18.28 mgL⁻¹ and 14.03 mgL⁻¹, to tebuconazol 0.32 and 0.77 mgL⁻¹ and to tetraconazol 3.53 mgL⁻¹ and 3.96 mgL⁻¹. The IC₅₀s, determined in this work, may be used as a reference to the conduction of future work on *P. pachyrhizi* sensitivity to this fungicides.

Key-words: fungitoxicity, strobilurins, triazoles, asian soybean rust.

1 INTRODUÇÃO

Muitas metodologias têm sido descritas para mensuração da fungitoxicidade de uma substância química (AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 1947; SHARVELLE, 1961; GEORGOPOULOS, 1982; RUSSEL, 2004), tendo como objetivo o estudo, em si, da sensibilidade de um fungo a um determinado fungicida ou ainda o monitoramento da redução parcial ou mesmo a perda da sensibilidade (resistência).

Ensaio *in vivo* são necessários para patógenos biotróficos, nos quais procedimentos *in vitro* não estejam compatíveis com os objetivos almejados. Esses ensaios também podem ser utilizados para patógenos necrotróficos, se a utilização de técnicas *in vitro* for considerada inapropriada (RUSSEL, 2004). Algumas metodologias estão disponíveis e a escolha por uma delas dependerá do patógeno alvo e das propriedades do fungicida. Testes *in vivo*, normalmente, incluem partes da planta destacadas (principalmente folhas), discos ou segmentos de folhas depositados sobre um meio de cultura contendo o fungicida ou em suspensão sobre uma solução do fungicida, ou, ainda, plântulas inteiras (HOLMES & CHANNON, 1984; REUVENI et al., 1985; COOK, 1989; GENET et al, 1997; GHINI & KIMATI, 2000; ARRAIANO et al, 2001; MILLER & GUBLER, 2004; RUSSEL, 2004; REIS et al., 2005).

A utilização do método de folhas (ou folíolos) de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] destacados para a comparação de genótipos, quanto à resistência a diferentes patógenos, tem sido descrito por

muitos autores (WEGULO et al., 1998; KAMIKOGA & LIMA, 2001; FENILLE et al., 2002; KULL et al., 2003; FRANCO et al., 2009).

Para a ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd.), a metodologia de folíolos destacados é descrita por Yeh (1983) em seus estudos para diferenciação de raças fisiológicas, sendo sua eficiência comprovada por outros autores, com distintos objetivos de pesquisa (BURDON & MARSHALL, 1981; BANDYOPADHYAY et al., 2007; TWIZEYIMANA et al., 2007; ZAMBENEDETTI MAGNANI et al., 2007; LI et al., 2008), assim como sua correlação com resultados obtidos em casa de vegetação e campo (TWIZEYIMANA et al., 2007).

Scherb e Mehl (2006), sugerem metodologia, semelhante à descrita anteriormente, para a realização de testes de sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas, com destaque para fungicidas do grupo dos inibidores da desmetilação (IDMs), o que pode ser observado em trabalhos realizados por Buzzerio et al. (2007), Iamamoto (2007) e Furlan e Scherb (2007).

Uma substância química em função de suas características, inerentes à molécula química, apresenta fungitoxicidade. Por outro lado, um fungo, em função de suas características genéticas apresenta, ou não, sensibilidade a uma dada molécula. Se um fungo for sensível a um fungicida, este apresenta fungitoxicidade; em caso contrário, é atóxico. Se o fungicida não apresenta fungitoxicidade, o fungo é, então, considerado insensível (REIS et al., 2007).

Parâmetros como a DE_{50} (dose efetiva ou eficaz que promove um efeito desejado em 50% dos microrganismos submetidos ao teste), DL_{50} (dose letal), CL_{50} (concentração letal), CE_{50}

(concentração efetiva), IC_{50} (inibição do crescimento), CI_{50} (concentração inibitória) ou CMI (concentração mínima inibitória), definem a fungitoxicidade de uma substância química (SHARVELLE 1961; TORGESON, 1967; EDGINGTON et. al., 1971; LOOMIS, 1995; RUSSEL, 2004; SILVA, 2006; OGA et al., 2008).

Valores de CI_{50} , para diferentes fungicidas e específicos a *P. pachyrhizi*, na cultura da soja, obtidos em testes *in vivo*, ainda são escassos na literatura, contudo muito úteis na condução de trabalhos de pesquisa e monitoramento de sensibilidade, principalmente, em regiões onde a demanda pelo uso de fungicidas na cultura é intensa.

Portanto, objetivou-se com este trabalho a determinação da fungitoxicidade de alguns fungicidas a *P. pachyrhizi*, na cultura da soja, *in vivo*, com um isolado considerado sensível.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio para quantificação da sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas, *in vivo*, foi conduzido em câmara climatizada, no laboratório de Fitopatologia (Micologia) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo - UPF (Passo Fundo/RS), no ano de 2007. Para cada fungicida testado, o ensaio foi conduzido duas vezes (Experimentos 1 e 2).

O inóculo da ferrugem da soja utilizado no experimento foi proveniente de uma amostra da população de uredosporos, obtida de plantas naturalmente infectadas, na safra de 2004/05, no campo experimental da FAMV-UPF. Este foi mantido e multiplicado em

vasos contendo plantas de soja (sobre o cultivar BRS 154 nos anos de 2005 e 2006 e, após, sobre o cultivar CD 219 RR, em função da sua menor suscetibilidade ao oídio - *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takamatsu), num ambiente parcialmente controlado (22 ± 2 °C e 14 horas de fotoperíodo) e sem exposição a nenhum tipo de fungicida, desde março de 2005. Esta amostra da população de uredosporos, que deu origem ao inóculo utilizado nos experimentos, será aqui designada como “isolado sensível”.

Os uredosporos de *P. pachyrhizi*, utilizados para as inoculações no decorrer do experimento, foram removidos das folhas de soja por agitação, manual, dentro de um recipiente fechado (erlenmeyer), contendo água destilada com duas gotas.L⁻¹ do surfactante Tween 20 (marca registrada).

Para a determinação da fungitoxicidade a *P. pachyrhizi*, os ingredientes ativos testados foram azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobin, trifloxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol, metconazol, miclobutanil, tebuconazol e tetraconazol, utilizando-se as seguintes formulações (fungicidas isolados): Piori 250 SC (azoxistrobina), Aproach 250 SC (picoxistrobina), Comet 250 CE (piraclostrobina), Twist 125 CE (trifloxistrobina), Alto 100 CE (ciproconazol), Opus 125 SC (epoxiconazol), Impact 125 SC (flutriafol), Caramba 90 CE (metconazol), Systhane 250 CE (miclobutanil), Folicur 200 CE (tebuconazol) e Domark 100 CE (tetraconazol).

Os fungicidas utilizados no experimento foram diluídos em água destilada e esterilizada, nas devidas concentrações.

As concentrações finais testadas variaram para os diferentes princípios ativos, conforme: azoxistrobina (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 1 mg L⁻¹), picoxistrobina (0; 0,01; 0,1; 0,5 e 1 mg L⁻¹), piraclostrobina (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 1 mg L⁻¹), trifloxistrobina (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1 mg L⁻¹), ciproconazol (0; 0,25; 0,5; 2 e 4 mg L⁻¹), epoxiconazol (0; 0,078; 0,156; 0,3125; 1,25; 2,5 e 5 mg L⁻¹), flutriafol (0; 7,5; 15; 30 e 60 mg L⁻¹), metconazol (0; 1; 2; 3; 4 e 5 mg L⁻¹), miclobutanil (0; 5; 10; 15; 20 e 30 mg L⁻¹), tebuconazol (0; 0,125; 0,25; 0,5; 2,5 e 5 mg L⁻¹) e tetraconazol (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg L⁻¹), na primeira vez em que foi realizado o experimento.

Quando o ensaio foi repetido (Experimento 2), algumas concentrações foram ajustadas, conforme: azoxistrobina (0; 0,025; 0,05; 0,1 e 1 mg L⁻¹), picoxistrobina (0; 0,025; 0,05; 0,1 e 1 mg L⁻¹), piraclostrobina (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 1 mg L⁻¹), trifloxistrobina (0; 0,025; 0,05; 0,1 e 1 mg L⁻¹), ciproconazol (0; 0,125; 0,5; 2,5; 5 e 10 mg L⁻¹), epoxiconazol (0; 0,3125; 0,625; 2,5 e 10 mg L⁻¹), flutriafol (0; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 mg L⁻¹), metconazol (0; 0,5; 1; 2; 4 e 8 mg L⁻¹), miclobutanil (0; 5; 10; 20 e 40 mg L⁻¹), tebuconazol (0; 0,05; 0,5; 5; 10 e 50 mg L⁻¹) e tetraconazol (0; 1; 2; 3; 4 e 40 mg L⁻¹).

A metodologia utilizada baseou-se no método de folíolos de soja destacados, proposto pelo Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas - FRAC (SCHERB & MEHL, 2006), com modificações na metodologia de avaliação.

Os folíolos de soja, utilizados no teste de fungitoxicidade *in vivo*, foram provenientes de plantas de soja (cultivar CD 219 RR) cultivadas em ambiente parcialmente controlado (22 ± 2 °C e 14 horas de fotoperíodo). Utilizaram-se para o cultivo copos plásticos (volume

de 300 mL) contendo substrato para produção de mudas de hortaliças, onde foram semeadas cinco sementes de soja por copo, sendo estes dispostos em bandejas plásticas para manutenção da água necessária ao desenvolvimento das plantas. Após o início da expansão do segundo trifólio, folíolos centrais do primeiro trifólio, das plantas de soja cultivadas, foram seccionados, com o auxílio de uma tesoura, a 0,5 cm da base do folíolo, e acondicionados em uma bandeja para condução dos testes.

Previamente, dentro de caixas gerbox (caixas de poliestireno cristal, 11 cm x 11 cm x 3,5 cm de altura, contendo tampas) foram recortados (no tamanho interno da caixa) e depositados sobre o fundo, uma lâmina de espuma de polietileno (0,3 mm de espessura) e, sobre esta, duas folhas de papel filtro (Whatman nº 6), que foram embebidos, com água destilada, até que a espuma ficasse saturada. Prepararam-se para cada tratamento avaliado quatro caixas gerbox.

Uma vez destacados os folíolos de soja, imediatamente, os tratamentos fungicidas foram aplicados sobre os folíolos. Este processo ocorreu 24 horas antes da inoculação e consistiu na imersão, por três segundos, de cada folíolo (com o auxílio de uma pinça) em uma suspensão fungicida, contida em um becker. O volume final da suspensão de cada concentração fungicida testada foi de 100 mL. Após a imersão, os folíolos foram depositados dentro das caixas gerbox, com a epiderme adaxial do folíolo voltada para baixo, sendo distribuídos quatro folíolos por caixa, totalizando dezesseis folíolos por tratamento. No decorrer das 24 horas seguintes, as caixas foram

mantidas fechadas, em temperatura ambiente e com fotoperíodo de 12 h.

Decorridas 24 horas procedeu-se à inoculação com os uredosporos de *P. pachyrhizi*, removidos de folhas de plantas de soja previamente inoculadas, conforme descrito anteriormente. Utilizou-se a concentração de 4×10^4 uredosporos mL^{-1} . A inoculação foi realizada com o auxílio de um pulverizador manual (Pulverizador Ultrajet 500 mL, marca Guarany), sendo pulverizado, aproximadamente, um volume de suspensão de uredosporos de 10 mL por caixa gerbox. Após, estas caixas, tampadas, foram mantidas no escuro por um período de 12 horas a uma temperatura de 22 ± 2 °C e, em seguida, na mesma temperatura e sob um fotoperíodo de 14 horas, permaneceram na câmara de incubação por mais um período, totalizando 15 dias a partir do momento da inoculação onde, nos tratamentos testemunhas, visualizavam-se com clareza os sinais do patógeno. Durante este período, uma vez que no local de incubação não havia controle de umidade relativa do ar, tomou-se o cuidado de manter a superfície dos papéis filtro, nas caixas gerbox, saturada com água destilada.

Decorrido o tempo previsto para a incubação, surgimento dos sintomas e sinais da doença, os folíolos foram submetidos à avaliação, que constou da quantificação do número de lesões e do número de pústulas (esporulantes), de *P. pachyrhizi*, por cm^2 . A unidade experimental foi constituída de um folíolo, sendo realizada a avaliação em dois centímetros quadrados por folíolo. Estas áreas foram demarcadas na região central do folíolo, uma de cada lado da nervura central. Foram avaliados 16 folíolos por tratamento.

A quantificação do número de lesões e do número de pústulas de *P. pachyrhizi*, nos folíolos, foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópio (Zeiss - Stemi 2000 C).

A fungitoxicidade para os diferentes fungicidas, representada pela CI_{50} foi estimada para as variáveis número de lesões e número de pústulas, por cm^2 , de *P. pachyrhizi*. Os dados foram expressos em percentagem de controle, em relação à testemunha sem a presença do fungicida, através da redução do número de lesões e do número de pústulas por cm^2 . Também, para os diferentes fungicidas e respectivas concentrações, obtiveram-se os valores do número de pústulas por lesão. Os valores de CI_{50} , para o número de lesões e número de pústulas de *P. pachyrhizi*, para cada ingrediente ativo, foram estimados por meio do procedimento Probit utilizando-se o software estatístico SAS, versão 8.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fungitoxicidade dos diferentes fungicidas, *in vivo*, para as duas vezes em que o ensaio foi realizado, foi determinada para o número de lesões e para o número de pústulas por cm^2 de *P. pachyrhizi* e encontra-se representada nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, assim como, nas Figuras 2 e 3 inclusas nos Apêndices A até K. Também, nas Figuras de 2 e 3 podem ser observados os valores referentes à percentagem de redução no número de pústulas por lesão de *P. pachyrhizi*, para cada fungicida, nas diferentes concentrações testadas.

Com relação ao número de lesões por cm², para os fungicidas estrobilurinas os valores de CI₅₀, apresentados na Tabela 1, ficaram na faixa entre 0,05 a 0,23 mg L⁻¹ para azoxistrobina; 0,02 a 0,26 mg L⁻¹ para picoxistrobina; 0,05 a 0,41 mg L⁻¹ para piraclostrobina e 0,05 a 0,22 mg L⁻¹ para trifloxistrobina.

Para o número de pústulas de *P. pachyrhizi* por cm² (Tabela 2), os valores de CI₅₀ ficaram na faixa entre 0,04 a 0,28 mg L⁻¹ para azoxistrobina; 0,01 a 0,21 mg L⁻¹ para picoxistrobina; 0,04 a 0,28 mg L⁻¹ para piraclostrobina e 0,04 a 0,22 mg L⁻¹ para trifloxistrobina.

Tabela 1. Concentração inibitória (mg L⁻¹) de fungicidas estrobilurinas para reduzir em 50% o número de lesões por cm² de *Phakopsora pachyrhizi*, isolado sensível, em folíolos de soja destacados

Fungicida		CI ₅₀ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (95%)	Erro
Azoxistrobina	Experimento 1	0,127*	0,06 - 0,23	0,27
	Experimento 2	0,093	0,05 - 0,17	0,47
Picoxistrobina	Experimento 1	0,129	0,02 - 0,23	0,39
	Experimento 2	0,133	0,06 - 0,26	0,48
Piraclostrobina	Experimento 1	0,202	0,08 - 0,37	0,25
	Experimento 2	0,181	0,05 - 0,41	0,39
Trifloxistrobina	Experimento 1	0,131	0,06 - 0,21	0,36
	Experimento 2	0,104	0,05 - 0,22	0,61

* Valores estimados pelo procedimento Probit

Tanto para a variável número de lesões como para o número de pústulas por cm², pode-se observar redução nos valores

quantificados em função dos aumentos das concentrações testadas.

Tabela 2. Concentração inibitória (mg L^{-1}) de fungicidas estrobilurinas para reduzir em 50% o número de pústulas por cm^2 de *Phakopsora pachyrhizi*, isolado sensível, em folíolos de soja destacados

Fungicida		CI_{50} (mg L^{-1})	Intervalo de confiança (95%)	Erro
Azoxistrobina	Experimento 1	0,150*	0,06 - 0,28	0,30
	Experimento 2	0,076	0,04 - 0,14	0,47
Picoxistrobina	Experimento 1	0,117	0,01 - 0,21	0,12
	Experimento 2	0,107	0,06 - 0,20	0,58
Piraclostrobina	Experimento 1	0,108	0,04 - 0,21	0,30
	Experimento 2	0,135	0,04 - 0,28	0,43
Trifloxistrobina	Experimento 1	0,134	0,06 - 0,21	0,44
	Experimento 2	0,097	0,04 - 0,22	0,83

* Valores estimados pelo procedimento Probit

Também se observou uma tendência para maiores percentagens de controle, dentro de cada concentração, quando se avaliou o número de pústulas por cm^2 e menores quando se avaliou o número de pústulas por lesão, sugerindo-se, desta forma, uma maior sensibilidade no teste quando da avaliação da variável pústula por cm^2 , sendo esta, contudo, limitada pelo maior tempo necessário para a realização da avaliação (Figuras 3 e 4, dos Apêndices A, B, C e D).

Com relação à redução no número de lesões por cm^2 , na concentração mais elevada a que os fungicidas azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina foram submetidos ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), os controles obtidos foram de 95,4%, 98,6%, 90,9% e

98,0%; quando se avaliou o número de pústulas por cm² os controles foram de 95,4%, 99,3%, 94,5% e 99,0% e quando se avaliou o número de pústulas formadas por lesão os controles foram de 39,9%, 50,7%, 53,9% e 50,3%, respectivamente para os fungicidas testados (Figuras 3 e 4, dos Apêndices A, B, C e D).

Buzzerio (2007) conduzindo ensaios de monitoramento de sensibilidade de *P. pachyrhizi* a azoxistrobina, na safra de soja de 2006/07, no Brasil, descreve estimativa dos valores de CL₉₀ (90% de redução da população em teste - CL₉₀) numa faixa entre 0,0870 e 0,599 mg L⁻¹. O autor não descreve em seu trabalho o método de avaliação, contudo, relata que a metodologia segue recomendações do FRAC Internacional e do FRAC Brasil. Scherb e Mehl (2006) descrevem a metodologia proposta pelo FRAC, onde a doença é quantificada pela severidade (análise visual, através de uma escala de notas). Os valores dos experimentos aqui apresentados referem-se as CI_{50s}, quantificando-se variáveis de forma objetiva ou com maior sensibilidade, contudo, pode-se inferir que os intervalos de valores encontrados demonstram coerência com os resultados relatados por Buzzerio (2007).

Valores de DE₅₀ para o fungicida azoxistrobina, em outros patossistemas, são relatados. Wong e Wilcox (2000), para *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Bed. & De Toni, relatam valores DE₅₀ entre 0,24 mg L⁻¹ (0,037 - 0,78 mg L⁻¹) e 0,40 mg L⁻¹ (0,05 - 0,94 mg L⁻¹), respectivamente, para incidência e severidade da doença. Wone e Wilcox (2002), para *Uncinula necator* (Schw.) Burr, relatam valor de DE₅₀ na ordem de 0,0097 mg L⁻¹ (0,0037 - 0,028 mg L⁻¹). Jones et al. (2007), para *Phoma ligulicola* Baker, Dimock & Davis,

em ornamental do gênero *Chrysanthemum*, relatam DE_{50} entre valores de $0,007 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,193 \text{ mg L}^{-1}$. Keinath (2009) para *Didymella bryoniae* (Fuckel), em cucurbitáceas, DE_{50} no valor de $0,055 \text{ mg L}^{-1}$ (variando de $0,005$ a $0,81 \text{ mg L}^{-1}$).

Valor de DE_{50} para o fungicida piraclostrobina é descrito por Myresiotis et al. (2008) para *Botrytis cinerea* (De Bary) Whetzl, em hortaliças, na ordem de $0,033 \text{ mg L}^{-1}$. Avenot et al. (2008) relatam para *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., em pistache (*Pistacia vera* L.) DE_{50} , para isolados sensíveis, menor que $0,01 \text{ mg L}^{-1}$. Wise et al. (2008) relatam para *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), DE_{50} na faixa entre $0,0012$ a $0,0033 \text{ mg L}^{-1}$.

Chin et al. (2001), para trifloxistrobina no controle de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, na bananeira (*Musa* spp.), encontram valores de EC_{50} numa faixa entre $0,0003$ e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ (com valores médios entre $0,002$ e $0,003 \text{ mg L}^{-1}$). Vincelli e Dixon (2002), para *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., em *Lolium perenne* L., relatam para CE_{50} um intervalo entre $0,013$ a $0,078 \text{ mg L}^{-1}$. Miller e Gubler (2004), para *U. necator*, relatam o valor de $0,0128 \text{ mg L}^{-1}$ para a DE_{50} ($0,0089 - 0,0185 \text{ mg L}^{-1}$ de intervalo de confiança, a 95%).

Contrariamente ao observado para os fungicidas do grupo das estrobilurinas testados, as respostas observadas entre os fungicidas triazóis apresentaram uma maior amplitude para os valores de CI_{50} .

Considerando as duas vezes em que os experimentos foram realizados, o intervalo de confiança (95%) das CI_{50} , com relação ao número de lesões de *P. pachyrhizi* por cm^2 , para o fungicida ciproconazol ficou entre $0,11$ e $4,85 \text{ mg L}^{-1}$; para epoxiconazol entre $0,002$ e $2,38 \text{ mg L}^{-1}$; para flutriafol entre $8,06$ e

26,28 mg L⁻¹; para metconazol entre 1,15 e 3,10 mg L⁻¹; para miclobutanil entre 5,70 e 31,01 mg L⁻¹; para tebuconazol entre 0,12 e 1,44 mg L⁻¹ e para tetraconazol entre 1,39 e 6,97 mg L⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória (mg L⁻¹) de fungicidas triazóis para reduzir em 50% o número de lesões por cm² de *Phakopsora pachyrhizi*, isolado sensível, em folíolos de soja destacados

Fungicida		CI ₅₀ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (95%)	Erro
Ciproconazol	Experimento 1	1,25*	0,11 - 4,85	0,30
	Experimento 2	3,06	1,76 - 4,05	0,98
Epoconazol	Experimento 1	0,50	0,002 - 1,37	0,39
	Experimento 2	1,23	0,46 - 2,38	0,29
Flutriafol	Experimento 1	16,43	8,06 - 22,79	1,63
	Experimento 2	18,01	8,31 - 26,28	1,32
Metconazol	Experimento 1	2,50	1,15 - 3,10	1,30
Miclobutanil	Experimento 1	19,50	10,15 - 31,01	1,55
	Experimento 2	15,87	5,70 - 23,11	1,55
Tebuconazol	Experimento 1	0,41	0,12 - 0,85	0,24
	Experimento 2	0,81	0,31 - 1,44	0,28
Tetraconazol	Experimento 1	3,82	1,39 - 6,97	1,14
	Experimento 2	3,17	2,21 - 5,17	0,75

* Valores estimados pelo procedimento Probit

Considerando o número de pústulas de *P. pachyrhizi* por cm² (Tabela 4), para o fungicida ciproconazol o intervalo de confiança (95%) para a CI₅₀ ficou entre 0,05 e 1,91 mg L⁻¹; para epoconazol entre 0,02 e 1,18 mg L⁻¹; para flutriafol entre 2,59 e 19,99 mg L⁻¹; para metconazol entre 1,62 e 3,10 mg L⁻¹; para miclobutanil entre 4,60 e

25,52 mg L⁻¹; para tebuconazol entre 0,09 e 1,48 mg L⁻¹ e para tetraconazol entre 1,72 e 29,37 mg L⁻¹.

Com relação à variável número de pústulas por cm² (Tabela 4), não se obteve ajuste estatístico, com os valores observados na segunda vez em que os experimentos foram conduzidos, para os fungicidas ciproconazol e metconazol.

Tabela 4. Concentração inibitória (mg L⁻¹) de fungicidas triazóis para reduzir em 50% o número de pústulas por cm² de *Phakopsora pachyrhizi*, isolado sensível, em folíolos de soja destacados

Fungicida		CI ₅₀ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (95%)	Erro
Ciproconazol	Experimento 1	0,89*	0,05 - 1,91	0,43
	Experimento 2	0,61	0,17 - 1,18	0,29
Epoconazol	Experimento 1	15,35	8,28 - 19,99	2,35
	Experimento 2	11,21	2,59 - 19,85	0,91
Metconazol	Experimento 1	18,28	7,94 - 25,52	1,96
	Experimento 2	14,03	4,60 - 19,67	2,01
Tebuconazol	Experimento 1	0,32	0,09 - 0,64	0,25
	Experimento 2	0,77	0,26 - 1,48	0,36
Tetraconazol	Experimento 1	3,53	1,72 - 5,10	1,94
	Experimento 2	3,96	3,05 - 29,37	2,17

* Valores estimados pelo procedimento Probit

Para os fungicidas triazóis (IDMs) poucas informações a respeito de valores de CI₅₀s para *P. pachyrhizi*, na cultura da soja, *in vivo*, encontram-se relatadas.

Junqueira (1982), em trabalhos sobre controle químico de *P. pachyrhizi*, determinou valores de DE_{50s}, *in vivo* (número de lesões por cm²; folíolos não destacados), para os fungicidas benomil (7,5 mg L⁻¹), triadimefon (38,3 mg L⁻¹), triforine (18,3 mg L⁻¹), oxiclreto de cobre 296,2 mg L⁻¹), clorotalonil (5,7 mg L⁻¹) e maneb (0,75 mg L⁻¹). As DE_{50s} também foram determinadas *in vitro*, avaliando-se a germinação dos uredosporos e, com exceção do oxiclreto de cobre, apresentaram valores superiores.

Buzzerio (2007) conduzindo trabalhos de monitoramento de sensibilidade de *P. pachyrhizi*, *in vivo*, na safra de soja de 2006/07, no Brasil, avaliou o fungicida ciproconazol e relatou valores de CL_{90s} numa faixa entre 0,0934 e 0,5007 mg L⁻¹.

Os dados relatados por Buzzerio (2007), para o fungicida ciproconazol, não confirmam aqueles obtidos neste experimento, onde os valores de CI_{50s}, tanto para número de lesões como para número de pústulas *P. pachyrhizi* por cm², foram superiores. Contudo, a metodologia de quantificação da doença utilizada por Buzzerio (2007), difere da metodologia aqui utilizada, o que poderia justificar as variações nos resultados encontrados, em função da sensibilidade nas avaliações. O autor descreve em seu trabalho a metodologia, para quantificação do efeito do fungicida, recomendada pelo FRAC Internacional e FRAC Brasil (estimou a severidade da doença, por escala de notas).

Iamamoto (2007), avaliando quatro formulações comerciais de tebuconazol descreve valores de EC₅₀ na ordem de 0,65, 0,754, 1,5 e 3,1 mg L⁻¹. Furlan e Scherb (2007), também avaliando quatro formulações comerciais de tebuconazol, no Brasil, descrevem

valores de ED₅₀ na ordem de 0,54 (Folicur 200 CE), 0,81 (Orius 250 CE), 1,5 (Rival 200 CE) e 1,6 mg L⁻¹ (Tebuconazole Nortox), demonstrando, ambos, o que Russel (2004) alerta sobre possíveis variações em termos de valores de CI₅₀s quando, em comparações de testes de sensibilidade, são utilizadas diferentes formulações comerciais de um determinado fungicida.

Os valores descritos para o fungicida tebuconazol, nos experimentos aqui conduzidos (formulação Folicur 200 CE), tanto para o número de lesões como para o número de pústulas *P. pachyrhizi*, se aproximam e confirmam os valores descritos na literatura, como se pode observar nas Tabelas 3 e 4, onde para o número de lesões encontrou-se valores de CI₅₀ de 0,41 e 0,81 mg L⁻¹ e, para o número de pústulas, valores de CI₅₀ de 0,32 e 0,77 mg L⁻¹, respectivamente, para os experimentos 1 e 2.

Também, poucas informações de monitoramento da sensibilidade a fungicidas triazóis, *in vivo*, em outros patossistemas estão relatadas.

Ypema et al. (1997), relatam valores de Ec₅₀s, *in vivo* (discos de folha), para o fungicida miclobutanil na ordem de 6,07 mg L⁻¹, 3,17 mg L⁻¹ e 3,35 mg L⁻¹, para os anos de 1993, 1994 e 1995, respectivamente, em trabalhos de monitoramento da sensibilidade de *U. necator* a fungicidas.

Goulart (2009), avaliando dez isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), *in vivo*, descreve valores de DL₅₀s, para o fungicida epoxiconazol, que variaram de 0,158 a 1,034 mg L⁻¹.

Thygesen et al. (2009), para *Mycosphaerella graminicola* (Fückel) Schroeter em trigo (*Triticum aestivum* L.), avaliando diferentes isolados, relatam para o fungicida epoxiconazol valores de EC₅₀s numa faixa entre 0,007 a 1,15 mg L⁻¹.

Conforme o que foi proposto por Edgington et. al. (1971), definindo critérios para enquadrar uma substância fungicida com relação à sua fungitoxicidade, os fungicidas azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina, quando da avaliação do número de lesões e do número de pústulas de *P. pachyrhizi* por cm², seriam enquadrados como substâncias altamente fungitóxicas, por apresentarem DE₅₀, ou no caso CI₅₀, menor que 1,0 mg L⁻¹.

Portanto, segundo Edgington et. al. (1971), os fungicidas triazóis poderiam ser enquadrados em distintas categorias, como segue (avaliando número de lesões por cm²): epoxiconazol (no experimento 1) e tebuconazol como substâncias altamente fungitóxicas (CI₅₀ < 1,0 mg L⁻¹); ciproconazol, epoxiconazol (no experimento 2), flutriafol, metconazol, miclobutanil e tetraconazol como substâncias moderadamente fungitóxicas (CI₅₀ entre 1,0 e 50,0 mg L⁻¹). Avaliando o número de pústulas por cm², os fungicidas seriam classificados da seguinte forma: ciproconazol, epoxiconazol e tebuconazol ficariam enquadrados como substâncias altamente fungitóxicas (CI₅₀ < 1,0 mg L⁻¹); flutriafol, metconazol, miclobutanil e tetraconazol como substâncias moderadamente fungitóxicas (CI₅₀ entre 1,0 e 50,0 mg L⁻¹).

Em função da síntese de novos grupos químicos de fungicidas e novos mecanismos de ação, como os inibidores da desmetilação no ano de 1973 ou, ainda, as estrobilurinas no ano de

1992 (MORTON & STAUB, 2008), caberia, talvez aqui, a partir do que foi proposto por Edgington et. al. (1971), outro enquadramento para os fungicidas testados, na avaliação da sensibilidade à *P. pachyrhizi*, visto os resultados obtidos. Sugerindo-se: $CI_{50} < 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ = substância altamente fungitóxica; CI_{50} entre 0,1 e 20 mg L^{-1} = substância fungitóxica; CI_{50} entre 21 e 100 mg L^{-1} = substância moderadamente fungitóxica; $CI_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$ = substância não tóxica. Outros autores, conduzindo trabalhos em outros patossistemas, sugerem, também, modificações no que foi proposto por Edgington et. al. (1971), como exemplo, Tavares e Souza (2005); Ferreira et al. (2006) e Silva et al. (2006).

4 CONCLUSÕES

Os valores de CI_{50} s, determinados neste trabalho, podem ser utilizados como fator de referência para condução de trabalhos futuros de monitoramento da sensibilidade de *P. pachyrhizi* aos fungicidas azoxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol, metconazol, miclobutanil, tebuconazol e tetraconazol, na cultura da soja, *in vivo*.

Com relação aos valores de CI_{50} s, obtidos neste trabalho, se observou um comportamento diferenciado para os grupos químicos de fungicidas (IDMs e IQes) testados. Uma maior amplitude de valores foi constatada dentro do grupo dos IDMs .

As CI_{50} s dos fungicidas IQes é menor do que a dos IDMs.

As quantificações dos efeitos dos fungicidas, *in vivo*, na cultura da soja, em trabalhos que necessitem um maior rigor em termos de diferenciação de moléculas fungicidas ou mesmo concentrações, dentro de uma mesma molécula, deveriam ser conduzidas com base na avaliação do número de lesões e/ou número de pústulas de *P. pachyrhizi* por unidade de área foliolar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOLUS, C. J.; MIMS, C. W. BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. New York: John Willey & Sons, 1996.

ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; GODOY, C. V., BEGAMIN FILHO, A. Efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de *Phakopsora pachyrhizi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37., 2004, Gramado. *Resumos...* Brasília: Fitopatologia Brasileira, 2004. p. 207.

ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. Influência das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.) *Ferrugem asiática da soja*. UFV, DFP, Viçosa, MG, 2006, 140 p.

ALVES, M. C.; POZZA, E. A.; FERREIRA, J. B.; ARAÚJO, D. V.; COSTA, J. C. B.; DEUNER, C. C.; MUNIZ, M. F. S.; ZAMBENEDETTI, E. B.; MACHADO, J. C. Intensidade da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow) da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] nas cultivares conquista, savana e suprema sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. *Summa Phytopathologica*, v. 33, n. 3, p. 239-244, 2007.

AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. Committee of Standardization of Fungicidal Tests. Test tube dilution technique for use with the slide-germination method of evaluating protective fungicides. *Phytopathology*, v. 37, p. 354-356, 1947.

ARRAIANO, L. S.; BRADING, P. A.; BROWN, J. K. M. A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. *Plant Pathology*, v. 50, n. 3, p. 339-346, 2001.

AVENOT, H.; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine® (pyraclostrobin + boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing

alternaria late blight of pistachios in California. *Plant Pathology*, v. 57, n. 1, p. 135-140, 2008.

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

BAEZA, J. H. *Detection of soybean rust (Phakopsora pachyrhizi) in the states of Tamaulipas and San Luis Potosi, Mexico*. Disponível em: <<http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=192>>. Acesso em: 16 fev. 2008.

BANDYOPADHYAY, R.; OJIAMBO, P. S.; TWIZEYIMANA, M.; ASAFO-ADJEI, B.; FREDERICK, R. D.; PEDLEY, K. F.; STONE, C. L.; HARTMAN, G.L. First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Ghana. *Plant Disease*, v. 91, n. 8, p. 1057, 2007.

BAUER, R.; DOMINIK, B.; OBERWINKLER, F. *Ustilaginomycotina*, 2008. Disponível em: <<http://tolweb.org/Ustilaginomycotina/20530>>. Acesso em: 16 fev. 2009.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. Histology of the suscept-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the case of soybean rust. *Phytopathology*, v. 66, n. 11, p. 1290-1294, 1976.

BONDE, M. R.; BERNER, D. K.; NESTER, S. E.; FREDERICK, R. D. Effects of temperature on urediniospore germination, germ tube growth, and initiation of infection in soybean by *Phakopsora* isolates. *Phytopathology*, v. 97, n. 8, p. 997-1003, 2007.

BROMFIELD, K. R. *Soybean rust*. Monograph n. 11. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, 63 p., 1984.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science*, v. 20, p. 254-255, 1980.

BUCK, J. W.; WILLIAMS-WOODWARD, J. L. The effect of fungicides on urediniospore germination and disease development of daylily rust. *Crop Protection*, v. 22, n. 1, p. 135-140, 2003.

BURDON, J. J.; MARSHALL, D. R. Evaluation of Australian native species of *Glycine* for resistance to soybean rust. *Plant Disease*, v. 65, p. 44-45, 1981.

BUZZERIO, N. F.; BASSO, M. E.; LACHI, G. B.; LOVATO, B. V.; GONÇALVES, F. A.; PAIVA, S. B. Determinação de metodologia para produção de inóculo de *Phakopsora pachyrhizi* em condições de laboratório para fins de estudos de sensibilidade. *Summa Phytopathologica*, v. 33, supl., p. 61, 2007.

CARVALHO JÚNIOR, A. A.; FIGUEIREDO, M. B. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 26, n. 2, p. 197-200, 2000.

CASA, R. C.; REIS, E. M. Doenças relacionadas à germinação, emergência e estabelecimento de plântulas de soja em semeadura direta. In: REIS, E. M. (Ed.). *Doenças na cultura da soja*. Passo Fundo: Aldeia Norte, 2004. p. 21-32.

CHIN, K. M.; WIRZ, M.; LAIRD, D. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Disease*, v. 85, n.12, p. 1264-1270, 2001.

CHRISTENSEN, T. N. S.; BINDÉ, C. J. R. *Soja 80 anos de produção 1924-2004*. Santa Rosa: Lucano Cultura e Marketing, 2004, 220 p.

CLARKSON, J. P.; KENNEDY, R.; PHELPS, K., DAVIES, J.; BOWTELL, J. Quantifying the effect of reduced doses of propiconazole (Tilt) and initial disease incidence on leek rust development. *Plant Pathology*, v. 46, n. 6, p. 952-963, 1997.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Safras-grãos*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conbweb/download/safra>>. Acesso em: 14 fev. 2009.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. *Monitorando a dispersão da ferrugem asiática no Brasil*. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/?O_mapa_de_dispers%E3o>. Acesso em: 16 fev. 2009.

COOK, R. T. A. Control of *Glomerella cingulata* f.sp. *camelliae* with fungicidas. *Plant Pathology*, v. 38, n. 4, p. 514-519, 1989.

COSTA, A. C. T.; CARVALHO, A. O.; SOARES, D. J.; CARMO, M. G .F.; PIMENTEL, C. Condições de ambiente favoráveis à germinação e à infecção de *Puccinia substriata* var. *penicillariae* em diferentes cultivares de milho pérola. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, n. 5, p. 400-407, 2007.

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

ELLISON, P. J.; CULLIS, B. R.; BAMBACH, R. W.; KABLE, P. F. The effect of temperature on in vitro germination and germ tube growth of urediniospores of *Tranzschelia discolor*. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 41, n. 3, p. 479-488, 1990.

FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L.; KURAMAE, E. E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 108, n. 8, p. 783-792, 2002.

FERREIRA, E. M.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; MAFIA, R. G. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, n. 5, p. 468-475, 2006.

FORCELINI, C. A.; GOELLNER, C. I.; MIO, L. L. M. Resistência de fungos a fungicidas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 9, p. 339-381, 2001.

FRAC Code List: Fungicidas sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Disponível em: <http://www.frac.info/frac/publication/ahang/FRAC_Code_List_2009_web.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2009.

FRANCO, H. B. J.; CENTURION, M. P. P. C.; BARBOSA, J. C. Estudo de métodos de inoculação para a avaliação de cultivares de soja a *Fusarium tucumaniae*. *Summa Phytopathologica*, v. 35, n. 1, p. 32-38, 2009.

FREDERICK, R. D.; SNYDER, C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 92, n. 2, p. 217-227, 2002.

FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MATO GROSSO – FUNDAÇÃO MT. *Cultivares de soja*. Disponível em: <<http://www.fundacaomt.com.br/soja/>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

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

FURTADO, G. Q. Ferrugem asiática da soja: métodos de preservação dos urediniósporos e fatores relacionados à infecção do hospedeiro. 2007. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, 2007.

FURTADO, G. Q.; ALVES, S. A. M.; CZERMANSKI, A. B. C.; MOSSOLA JR., N. S. Preservação dos urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. *Summa Phytopathologica*, v. 31, supl., p. 79, 2005.

GARCIA, E. O.; CASAGRANDE, M. V.; RAGO, A. M.; MASSOLA JUNIOR, N. S. Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, v. 33, n. 2, p. 152-156, 2007.

GARCIA, A.; CALVO, E. S.; KIIHL, R. A. S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L. G. E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 117, p. 545-553, 2008.

GENET, J. L.; STEVA, H.; VINCENT, O.; CAZENAVE, C. A method for measuring the level of sensitivity of *Plasmopara viticola* populations to cymoxanil. *EPPO Bulletin*, v. 27, n. 2-3, p. 217-225, 1997.

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

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

GODOY, C. V.; FLAUSINO, A. M. Efeito da temperatura na germinação de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, viabilidade e sobrevivência em diferentes condições de armazenamento. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, supl., p. 124, 2004.

GOULART, C. A. Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (sacc & magn.) Briosi & Cav., a fungicidas sistêmicos. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

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

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to rust in soybean. *Crop Science*, v.26, p.1135-1136, 1986.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science*, v. 23, p. 237-239, 1983.

HOLMES, S. J. I.; CHANNON, A. G. Studies on metalaxyl-resistant *Phytophthora infestans* in potato crops in south-west Scotland. *Plant Pathology*, v. 33, n. 3, p. 347-354, 1984.

HUGHES, W. W. *Essentials of environmental toxicology: the effects of environmentally hazardous substances on human health*. Taylor & Francis, Washington, DC. 1996. 176 p.

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

JONES, S.; PETHYBRIDGE, S.; HAY, F.; GROOM, T.; WILSON, C. Baseline sensitivity of australian *Phoma ligulicola* isolates from pyrethrum to azoxystrobin and difenoconazole. *Journal of Phytopathology*, v. 155, n. 6, p. 377-380, 2007.

JUNQUEIRA, N. T. V. Controle químico da ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sid.) da soja. 1982. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1982.

KAMIKOGA, A. T. M.; LIMA, M. L. R. Z. C. *Método da folha destacada para avaliar resistência da soja ao oídio*. 2001. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/7431>>. Acesso em: 14 mai. 2009.

KAWUKI, R. S.; ADIPALA, E.; TUKAMUHABWA, P. Yield loss associated with soya bean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. *Journal of Phytopathology*, v. 151, n. 1, p. 7-12, 2003.

KEINATH, A. P. Sensitivity to azoxystrobin in *Didymella bryoniae* isolates collected before and after field use of strobilurin fungicides. *Pest Management Science*. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/122419550/abstract>>. Acesso em: 01 jul. 2009.

KILLGORE, E.; HEU, R. First report of soybean rust in Hawaii. *Plant Disease*, v. 78, n.12, p. 1216, 1994.

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

KOCHMAN, J. K. The effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 30, p. 273-277, 1979.

KOCHMAN, J. K.; BROWN, J. F. Effect of temperature, light and host on prepenetration development of *Puccinia graminis avenae* and *Puccinia coronata avenae*. *Annals of Applied Biology*, v. 82, n. 2, p. 241-249, 2008.

KOGA, L. J.; CANTERI, M. C.; CALVO, E. S.; UNFRIED, J. R.; GARCIA, A.; HARADA, A.; KIIHL, R. A. S. Análise multivariada dos componentes da resistência à ferrugem-asiática em genótipos de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1277-1286, out. 2008.

KULL, L. S.; VUONG, T. D.; POWERS, K. S.; ESKRIDGE, K. M.; STEADMAN, J. R.; HARTMAN, G. L. Evaluation of resistance screening methods for Sclerotinia stem rot of soybean and dry bean. *Plant Disease*, v. 87, n. 12, p. 1471-1476, 2003.

LANDGRAF, L. CBSOJA: Nova cultivar de soja facilita manejo da ferrugem. *Notícias Embrapa Soja*. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=533>. Acesso em: 12 nov. 2009.

LEVY, C. Zimbabwe - a country report on soybean rust control. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7, SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4, CONGRESSO BRASILEIRO DA SOJA, 3, 2004, Foz do Iguaçu. *Proceedings...* Londrina: Embrapa Soybean, 2004, p. 340-348.

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

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

LOPES, I. O. N. e OLIVEIRA, M. C. N. *Transformação probit: um exemplo de análise em dados de dose resposta*. Disponível em:

<<http://www.posgraduacao.ufla.br/gauss/congresso/11seagro/conteudo/arquivos/161.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2009.

MARCHETTI, M. A.; UECKER, F. A.; BROMFIELD, K. R. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. *Phytopathology*, St. Paul, v. 65, p. 822-823, 1975.

MARCHETTI, M. A.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by urediospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, v. 66, n. 4, p. 461-463, 1976.

McLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 31, p. 951-956, 1980.

MELCHING, J. S.; DOWLER, W. M.; KOOGLE, D. L.; ROYER, M. H. Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. *Plant Disease*, v. 73, n. 2, p. 117-122, 1989.

MILES, M. R., FREDERICK R. D.; HARTMAN, G. L. *Soybean rust: is the U.S. soybean crop at risk?* USDA-ARS and Department of Crop Science, University of Illinois, Urbana, IL 61801, 2003.

MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of the soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Health Progress*. 2006. doi 10.1094/PHP-0104-01-RS. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/germplasm/>>. Acesso em: 13 jan. 2009.

MILLER, T. C.; GUBLER, W. D. Sensitivity of California isolates of *Uncinula necator* to trifloxystrobin and spiroxamine, and update on triadimefon sensitivity. *Plant Disease*, v. 88, n. 11, p. 1205-1212, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO *Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários*. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 29 jan. 2009.

MOREL PAIVA, W. *Roya de la soja*. Itapúa: Ministerio de Agricultura y Ganadería, Subsecretaría de Agricultura, Dirección de Investigación Agrícola: Centro de Investigación Agrícola - CRIA, 2001. (Comunicado Técnico – Reporte Oficial, Série Fitopatología, 1).

MORTON, V.; STAUB, T. *A Short History of Fungicides*. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/fungi/>>. Acesso em: 10 jul. 2009.

MUELLER, D. S.; JEFFERS, S. N.; BUCK, J. W. Toxicity of fungicides to urediniospores of six rust fungi that occur on ornamental crops. *Plant Disease*, v. 89, n. 3, p. 255-261, 2005.

MYRESIOTIS, C. K.; BARDAS, G. A.; KARAOGLANIDIS, G. S. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine and benzimidazole resistant strains by these fungicides. *Plant Disease*, v. 92, n. 10, p. 1427-1431, 2008.

NARUZAWA, E. S.; CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; TOMQUELSKI, G. V.; BOLIANI, A. C. Estudos epidemiológicos e controle químico de *Phakopsora euvitidis*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, n. 1, p. 041-045, 2006.

NOJOSA, G. B.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE M. L.V. & ROMEIRO, R. S. (Ed.). *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos*. FEALQ, Piracicaba, SP, 2005, 263 p.

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

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

PIUGA, F. F.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; OLIVEIRA, A. C. B.; GUERZONI, R. A.; NUNES JÚNIOR, J.; PAIVA, W. M. Dupla infecção de *Phakopsora pachyrhizi* e *P. meibomia* em lavouras de soja no Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 25., 2003, Uberaba. *Resumos...* Uberaba: [s.n.], 2003. p. 166-167.

PIZA, S. M. T.; RIBEIRO, I. J. A. Influência da luz e da temperatura na germinação de uredosporos de *Puccinia psidii*. *Bragantia*, Campinas, v. 47, n. 1, p. 75-78, 1988.

PONTZEN, R.; SCHEINPFLUG, H. Effects of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. *Neth. J. Pl. Path.*, v. 95, n. 1, p. 151-160, 1989.

PRETORIUS, Z. A.; KLOPPERS, R. J.; FREDERICK, R. D. First report of Soybean Rust in South Africa. *Plant Disease*, v. 85, n. 12, p. 1288, 2001.

REIS, A.; RIBEIRO, F. H. S.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Sensitivity of brazilian isolates of *Phytophthora infestans* to commonly used fungicides in tomato and potato crops. *Plant Disease*, v. 89, n. 12, p. 1279-1284, 2005.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; MICHEL, C. Ocorrência de epidemia da ferrugem da soja no Rio Grande do Sul na safra 2001/2002. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, supl., p. 198, 2002.

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

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

REIS, E. M.; RICHTER, R. L. Efeito de substratos sobre a germinação de uredosporos e comprimento de tubos germinativos de *Puccinia triticina*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, n.1, p.75-78, 2007.

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

REUVENI, M.; SIEGEL, M. R.; NESMITH, W. C. Bioassays using detached tobacco leaves to determine the sensitivity of *Peronospora tabacina* to fungicides. *Pesticide Science*, v. 16, n.3, p. 244-250, 1985.

ROGERS, J.; REDDING, J. *USDA confirms soybean rust in United States*. APHIS New Release N° 0498.04. Disponível em: <<http://www.invasive.org/pests/soybeanrust/nr111004.cfm>>. Acesso em: 16 fev. 2009.

ROSSI, D. A.; COSTA, A. F.; ROSSI, D. F.; ENTRINGER, G. C.; DAHER, R. F.; SILVEIRA, S. F. Germinação *in vitro* de conídios de *Asperisporium caricae* (Speg) Maubl. agente causal da pinta-preta do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Disponível em: <http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/Fitopatologia/20080731_185350.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2009.

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

SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H. K. First Report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. *Plant Disease*, v. 89, n. 7, p. 774, 2005.

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

SCHERB, C. T; MEHL, A. 2006. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) - *Phakopsora pachyrhizi*: detached leaf test. Disponível em :

<http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/anhang/PHAKPA_de_tached_leaf_monitoring_method_BCS_2006_V1.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2009.

SILVA, C.; SOUZA, J. A. Sensibilidade *in vitro* de *Phakopsora pachyrhizi* a alguns fungicidas. *Summa Phytopathologica*, v. 31, supl., p. 79, 2005.

SILVA, P. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2006.

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

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

SLAMINKO, T. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; BONDE, M. R.; HARTMAN, G. L. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. *Plant Disease*, v. 92, n. 5, p. 767-771, 2008.

SOARES, R. M.; GAZZIERO, D. L. P.; MORITA, D. A. S.; CILIATO, M. L.; FLAUSINO, A. M.; SANTOS, L. C. M.; JANEGITZ, T. Utilização de glifosato para o controle de ferrugem da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 4, p. 473-477, 2008.

SOUZA, P. F. C.; ALVES, E.; CASTRO, H. A.; SOUZA, P. E.; ALMEIDA, A. M. R.; HOCHENBACH, S. R. Distribuição e identificação de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem da soja no estado de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 3, p. 672-677, 2007.

STADNIK, M. J.; ELGUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M. Efeito do extrato de *Ulva fasciata* e da quitosana na germinação de uredóporos de *Puccinia graminis* e na atividade de peroxidase em trigo. *Summa Phytopathologica*, v. 31, supl., p. 24, 2005.

STEWART, S.; GUILLIN, E. A.; DÍAZ, L. First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Uruguay. *Plant Disease*, v. 89, n. 8, p. 909, 2005.

TAPSOBA, H.; WILSON, J. P. Effects of temperature and light on germination of urediniospores of the pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* var. *indica*. *Plant Disease*, v. 81, n.9, p. 1049-1052, 1997.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.) *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA – REGIÃO CENTRAL DO BRASIL – 2009 e 2010. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados : Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 262 p.

TESSMANN, D.; DIANESE, J. C. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, n. 5, p. 538-542, 2002.

THYGESEN, K.; JORGENSEN, L. N.; JENSEN, K. S.; MUNK, L. Spatial and temporal impact of fungicide spray strategies on fungicide sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* in winter wheat. *European Journal of Plant Pathology*, v. 123, n. 4, p. 435-447, 2009.

TORGESON, D. C. Determination and Measurement of Fungitoxicity. In: TORGESON, D. C. *Fungicides: An Advanced Treatise*, v. 1. New York: Academic Press, 1967, 742 p.

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P. S.; IKOTUN, T.; PAUL, C.; HARTMAN, G. L.; BANDYOPADHYA, Y. R. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaf evaluations of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease*, v. 91, n. 9, p. 1161-1169, 2007.

VAKILI, N.G.; BROMFIELD, K. R. *Phakopsora* rust on soybean and other legumes in Puerto Rico. *Plant Disease Reporter*, v. 60, p. 995-999, 1976.

VINCELLI P.; DIXON D. E. Resistance to Q_oI (strobilurin-like) fungicides in isolates of *Pyricularia grisea* from perennial ryegrass. *Plant Disease*, v. 86, n. 3, p. 235-240, 2002.

WEGULO, S. N.; YANG, X. B.; MARTINSON, D C. A. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. *Plant Disease*, v. 82, n. 11, p. 1264-1270, 1998.

WISE, K. A.; BRADLEY, C. A.; PASCHE, J. S.; GUDMESTAD, N. C.; DUGAN, F. M.; CHEN, W. Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxystrobin, pyraclostrobin, and boscalid. *Plant Disease*, v. 92, n. 2, p. 295-300, 2008.

WONE F. P.; WILCOX W. F. Sensitivity to azoxystrobin among isolates of *Uncinula necator*: baseline distribution and relationship to myclobutanil sensitivity. *Plant Disease*, v. 86, n. 4, p. 394-404, 2002.

WONG, F. P.; WILCOX, W. F. Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*, v. 84, n. 3, p. 275-281, 2000.

YANG, C. Y. Past and present studies on soybean rust incited by *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Bullet. Inst. Trop. Agr.*, Kyushu University Japan, v. 2, p. 78-94, 1977.

YANG, X. B.; TCHANZ, A. T. DOWLER, D. W.; WANG, T. C. Development of yield loss models in relation to reduction of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, v. 81, p. 1420-1426, 1991.

YEH, C. C. Physiological races of *Phakopsora pachyrhizi* in Taiwan. *Jour. Agric. Res. China* v. 32, n. 1, p. 69-74, 1983. Disponível em: <http://www.tari.gov.tw/taric/uploads/journal_arc_32-1-7.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2009.

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

YORINORI, J. T. Epidemiologia e controle de *Phakopsora pachyrhizi*, safra 1987/88. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Resultados de pesquisa de soja 1988/89. Londrina: EMBRAPA CNPSo, 1989, p. 164-180.

YORINORI, J. T. Ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): ocorrência no Brasil e estratégias de manejo. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA, 2, 2002, Passo Fundo. *Resumos de palestras...* Passo Fundo: Aldeia Norte, 2002. p. 47-54.

YORINORI, J. T.; NUNES JUNIOR, J.; LAZZAROTTO, J. J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina: Embrapa Soja, 2004, 36 p.

YPEMA, H. L.; YPEMA, M.; GUBLER, W. D. Sensitivity of *Uncinula necator* to benomyl, triadimefon, myclobutanil, and fenarimol in California. *Plant Disease*, v. 81, n. 3, p. 293-297, 1997.

ZAMBENEDETTI, E. B. *Preservação de Phakopsora pachyrhizi Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (Glycine max (L.) Merrill)*. 2005. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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

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

APÊNDICES

APÊNDICE A - Fungicida Azoxistrobina

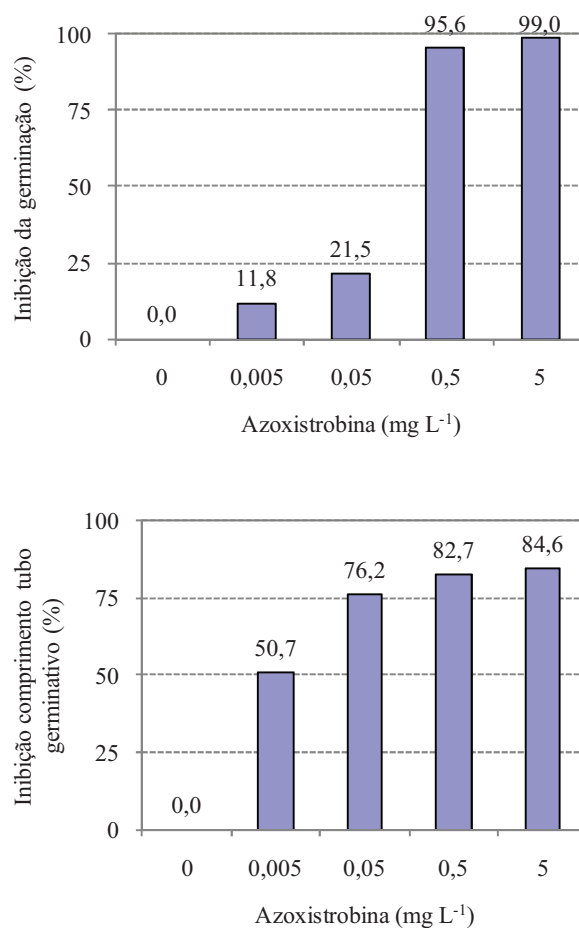


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida azoxistrobina no experimento 1

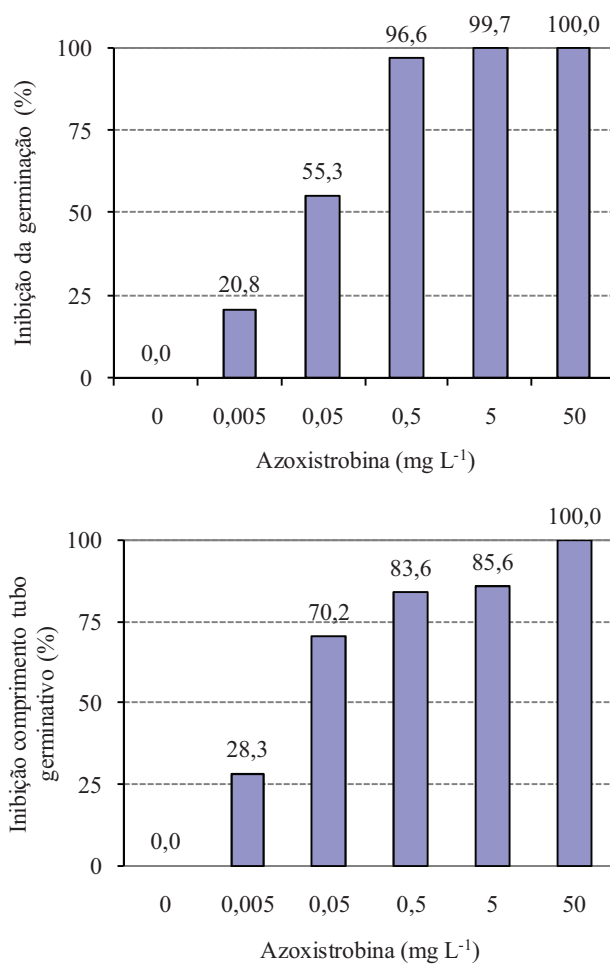


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida azoxistrobina no experimento 2

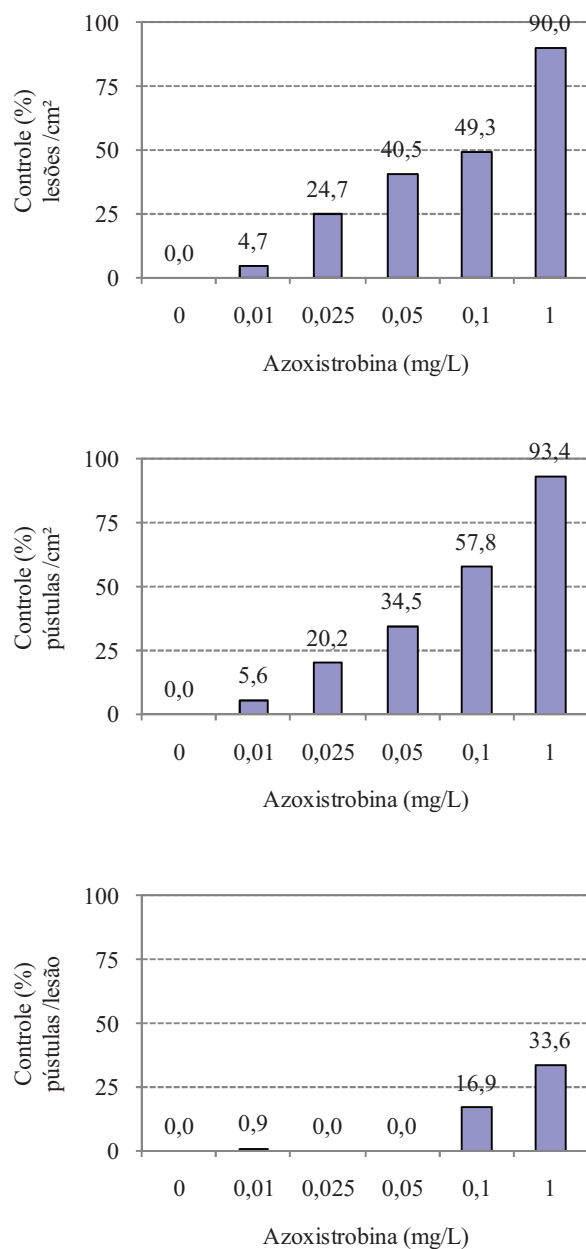


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos destacados de soja, para o fungicida azoxistrobina, no experimento 1

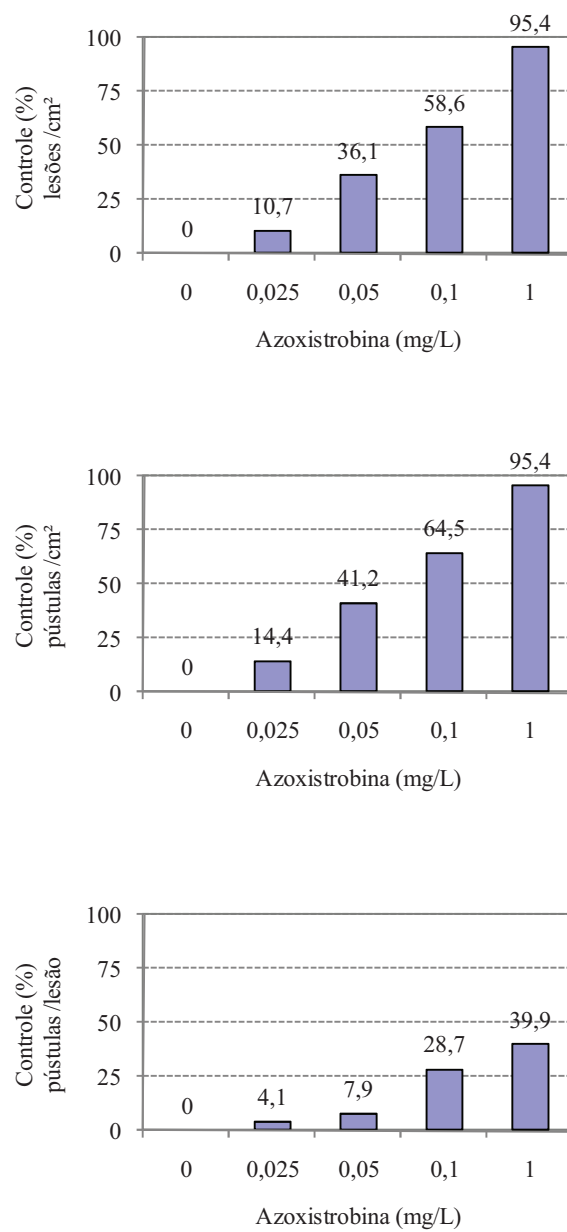


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos destacados de soja, para o fungicida azoxistrobina no experimento 2

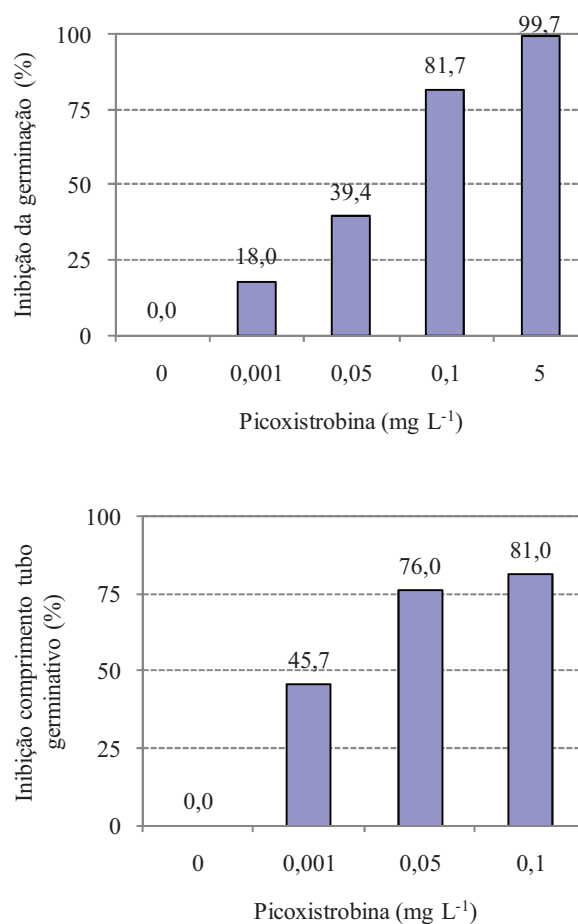
APÊNDICE B - Fungicida Picoxistrobina

Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida picoxistrobina no experimento 1

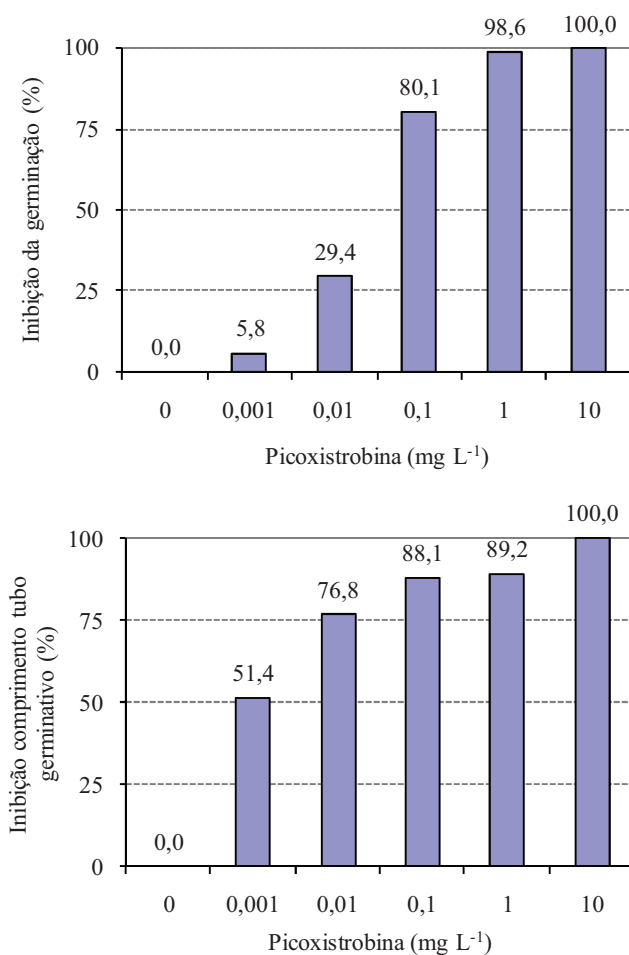


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida picoxistrobina no experimento 2

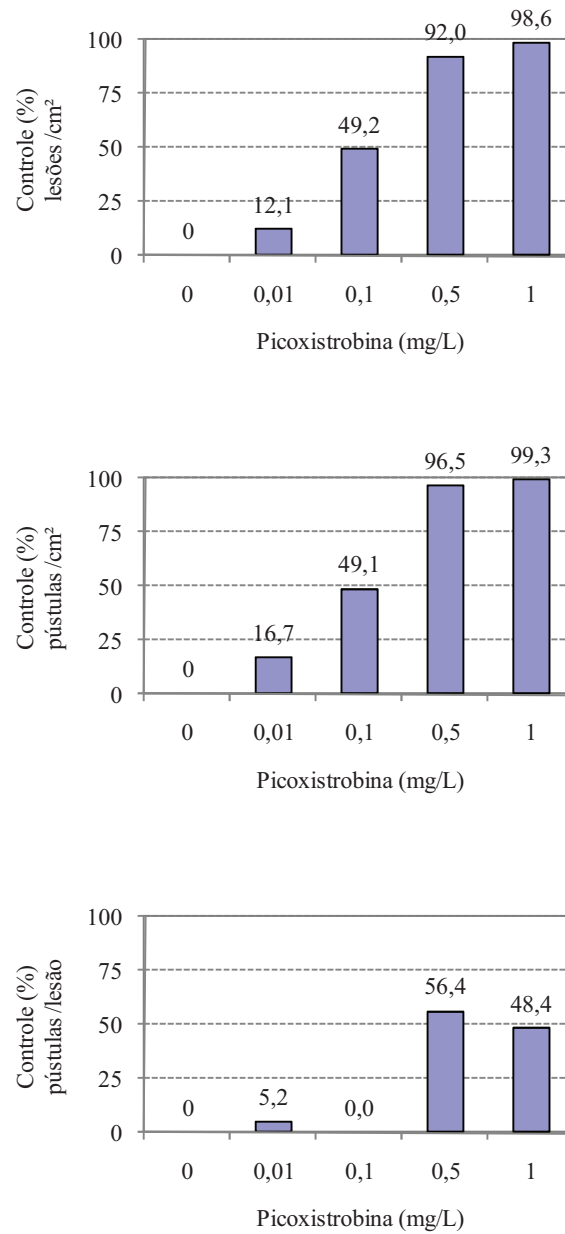


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos destacados de soja, para o fungicida picoxistrobina no experimento 1

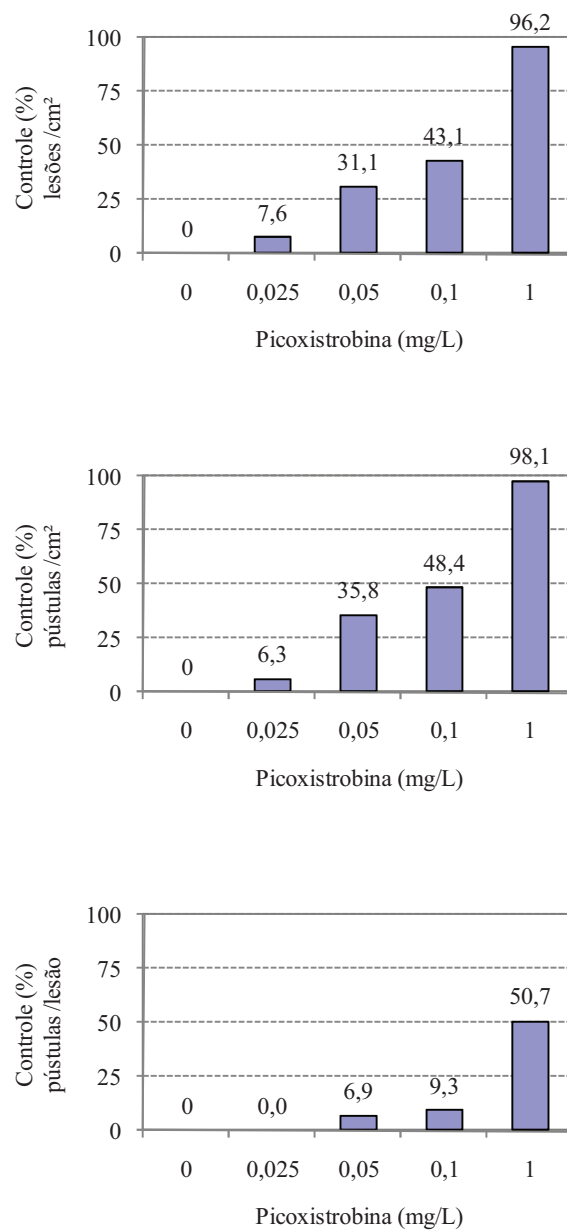


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos destacados de soja, para o fungicida picoxistrobina, no experimento 2

APÊNDICE C - Fungicida Piraclostrobina

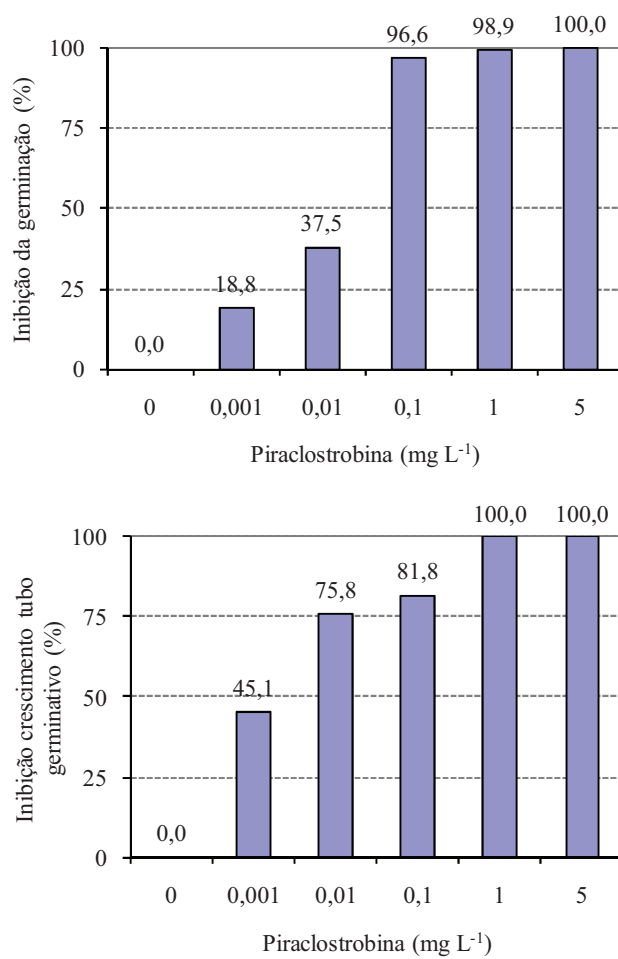


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida piraclostrobina no experimento 1

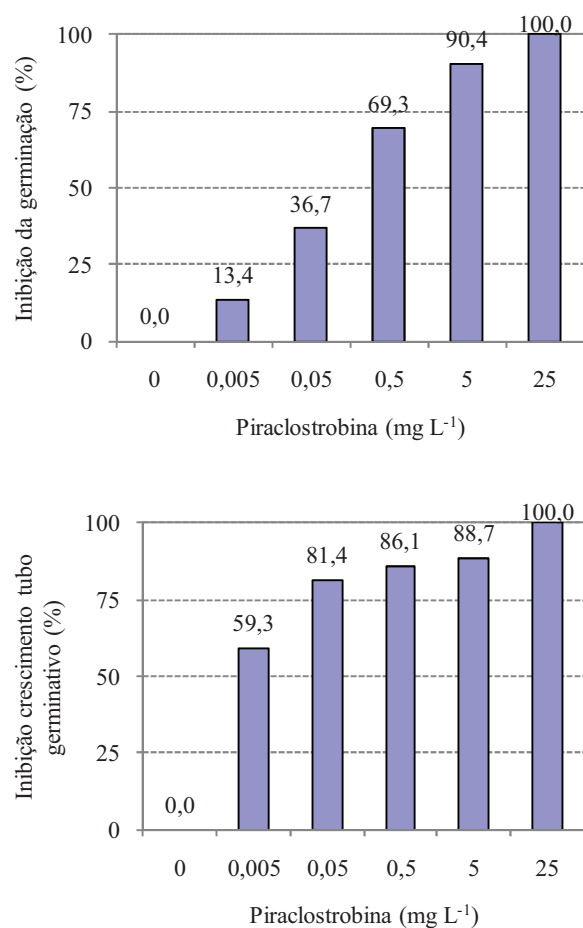


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida piraclostrobina no experimento 2

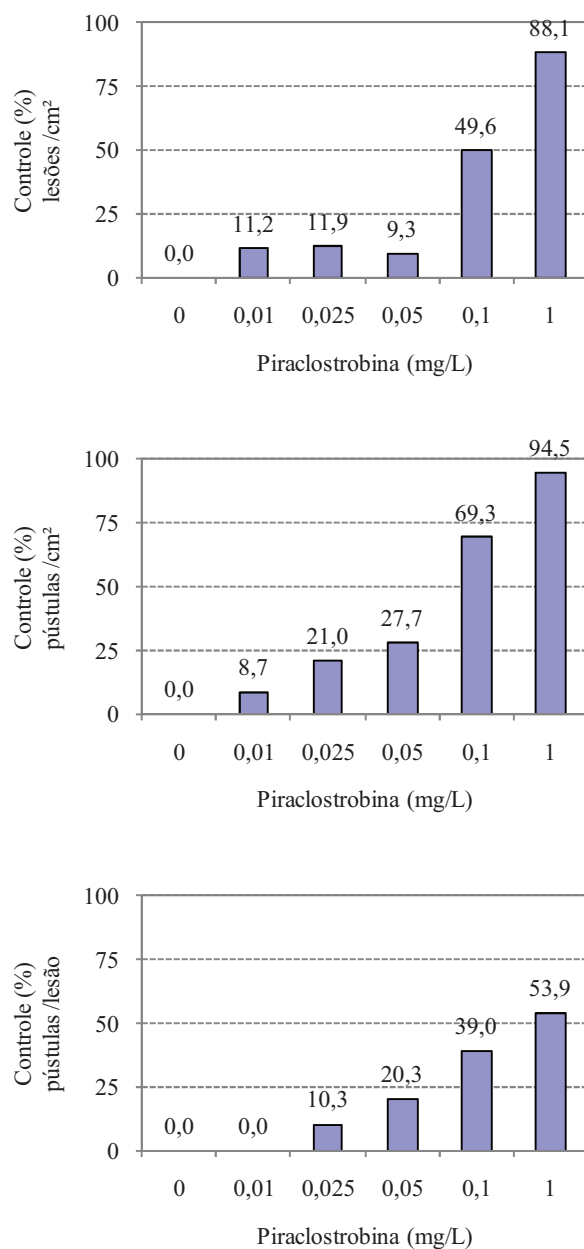


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida piraclostrobina, no experimento 1

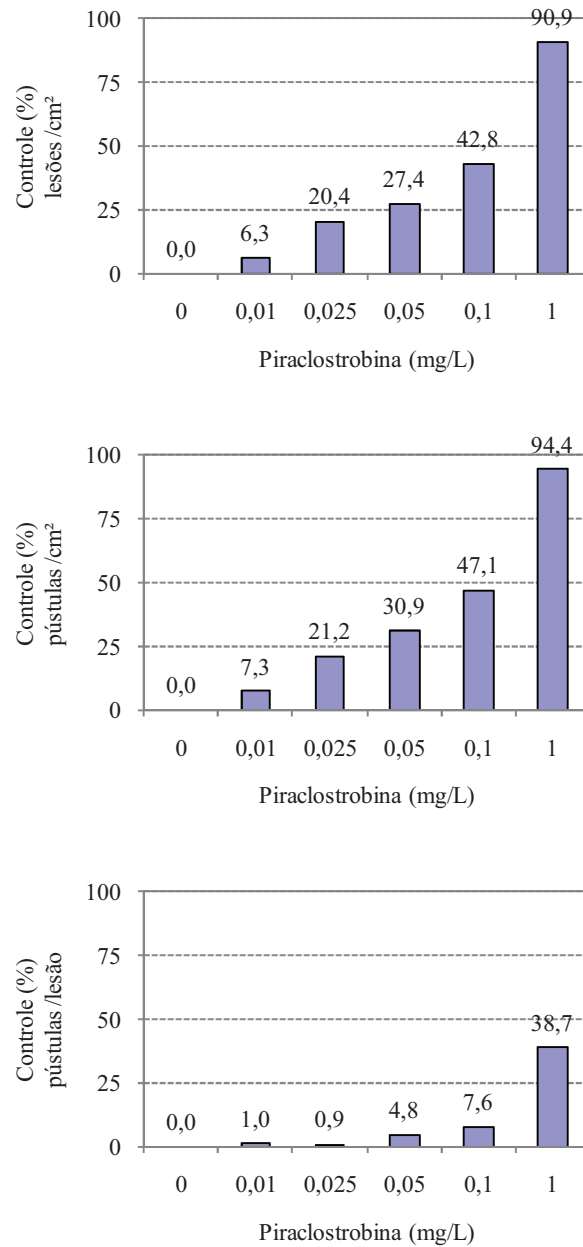


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida piraclostrobina, no experimento 2

APÊNDICE D - Fungicida Trifloxistrobina

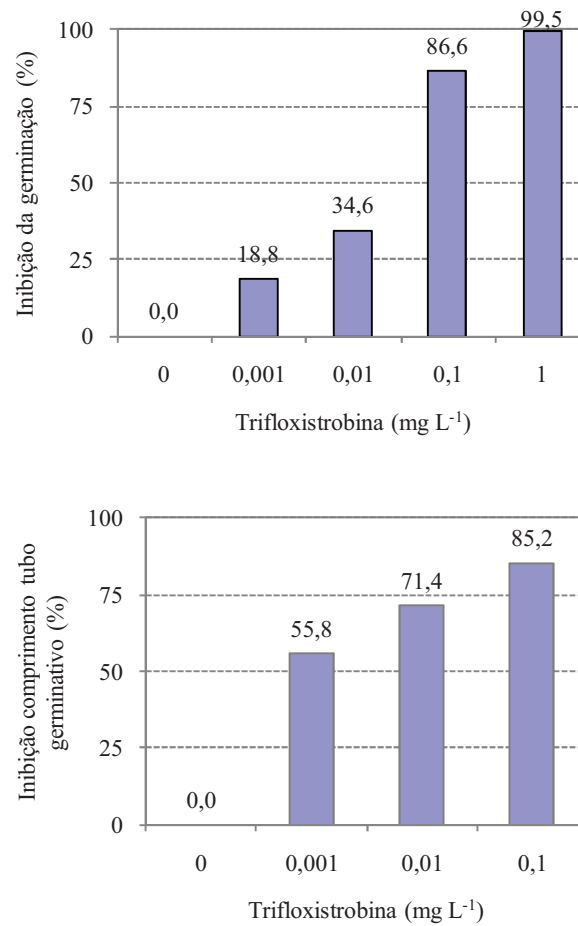


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida trifloxistrobina no experimento 1

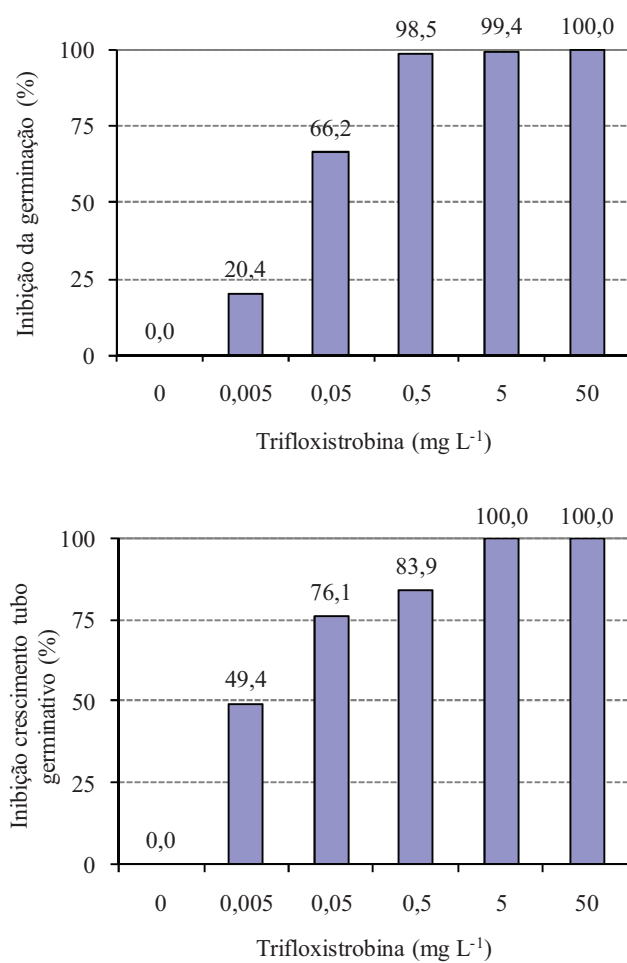


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida trifloxistrobina no experimento 2

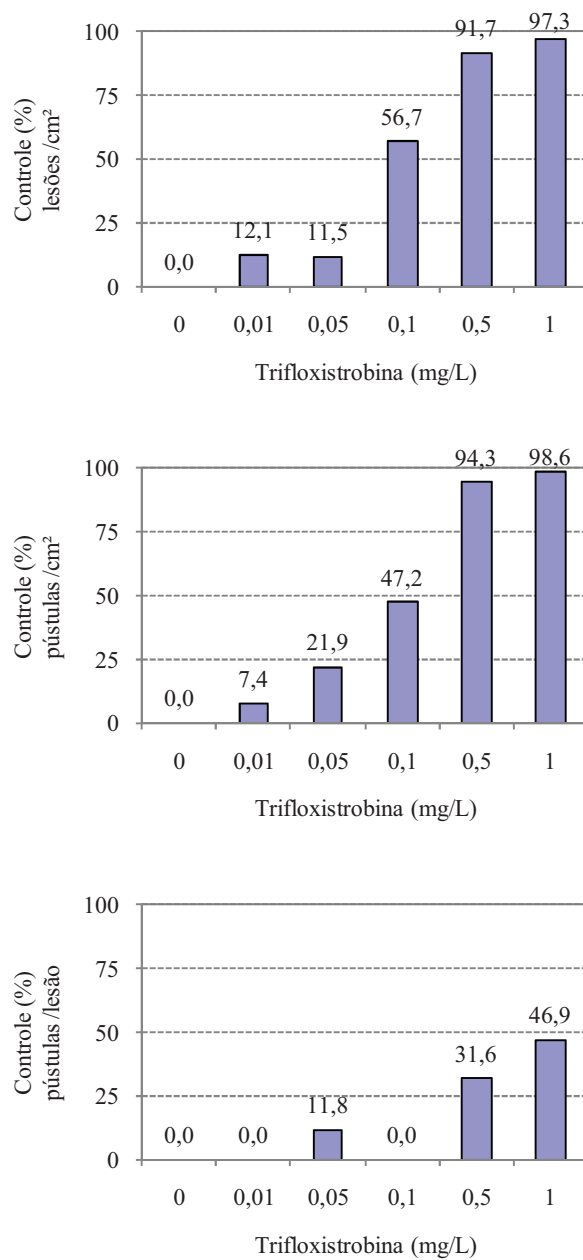


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida trifloxistrobina, no experimento 1

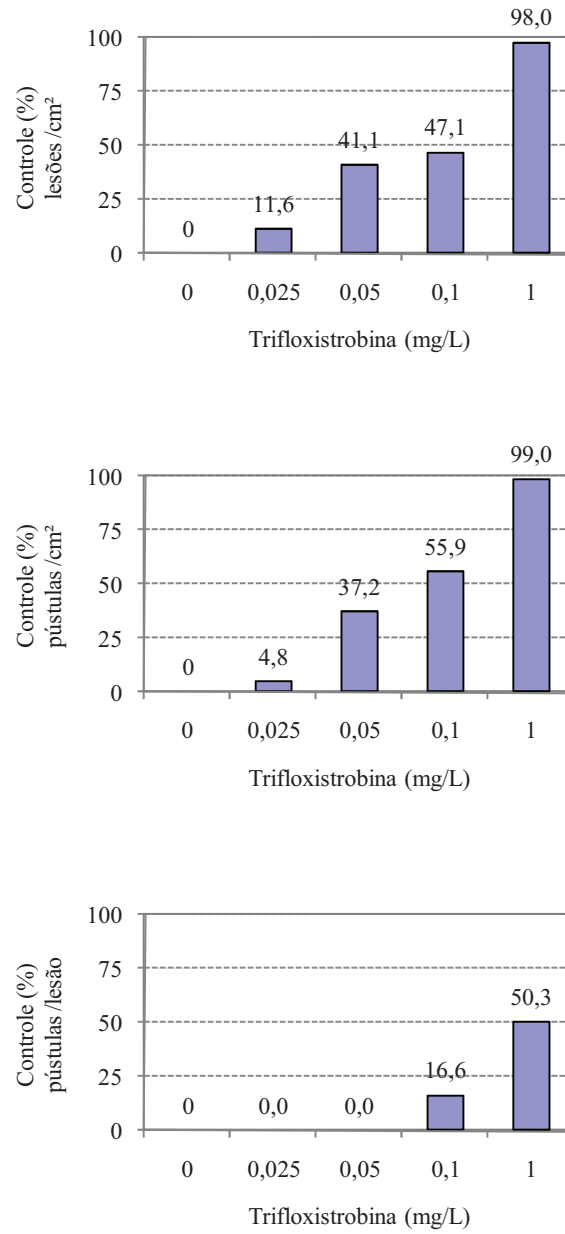


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida trifloxistrobina no experimento 2

APÊNDICE E - Fungicida Ciproconazol

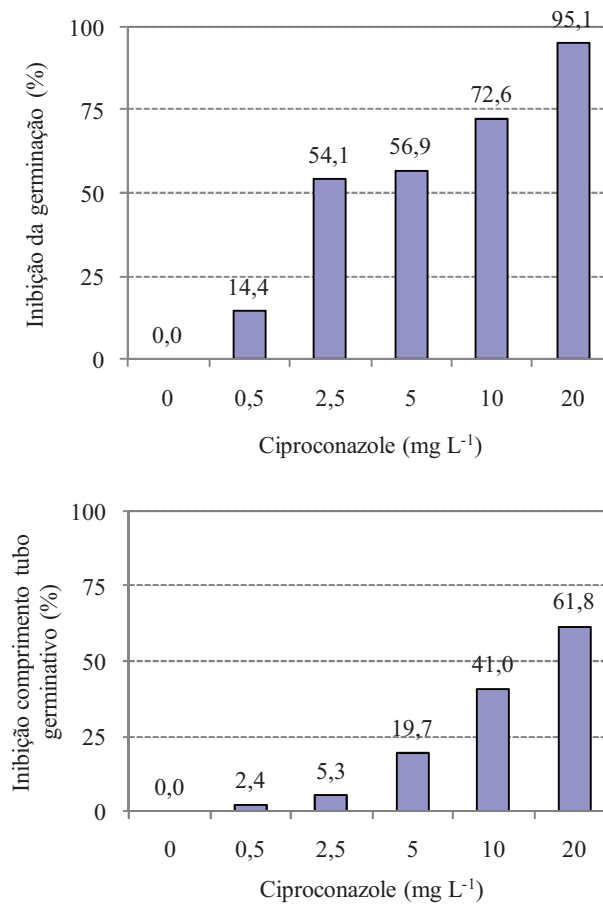


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida ciproconazol no experimento 1

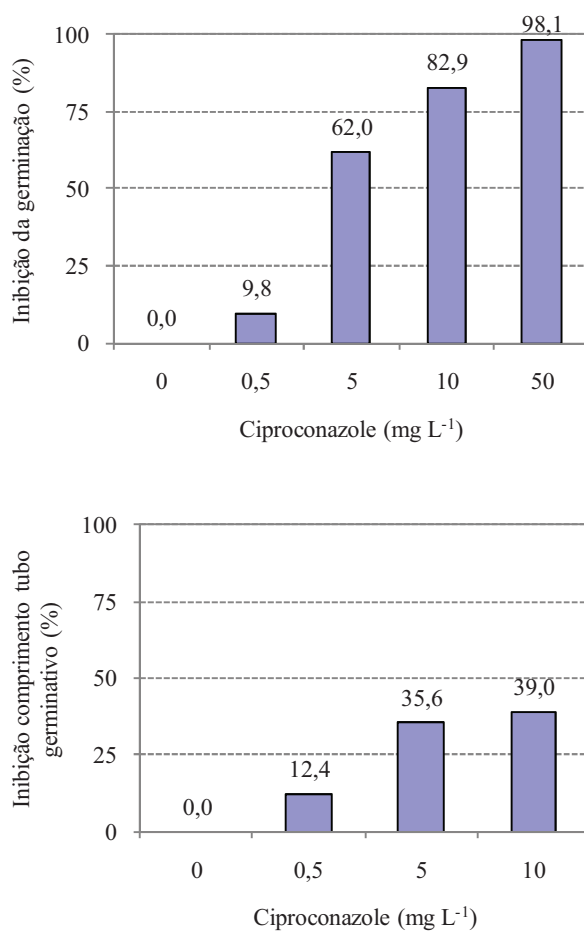


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida ciproconazol no experimento 2

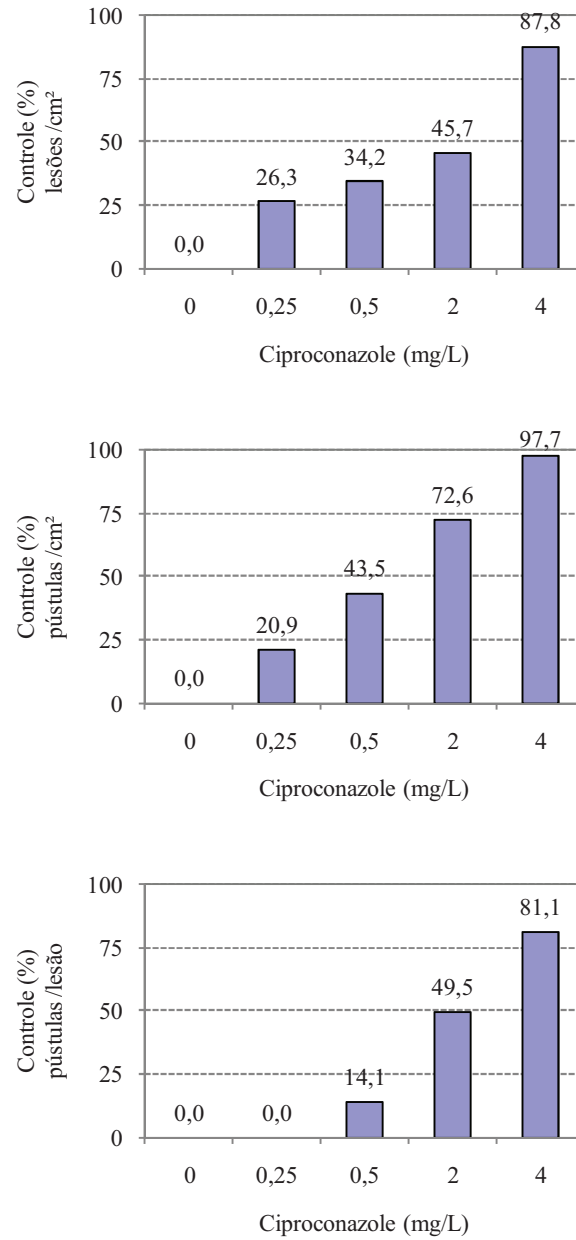


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida ciproconazol, no experimento 1

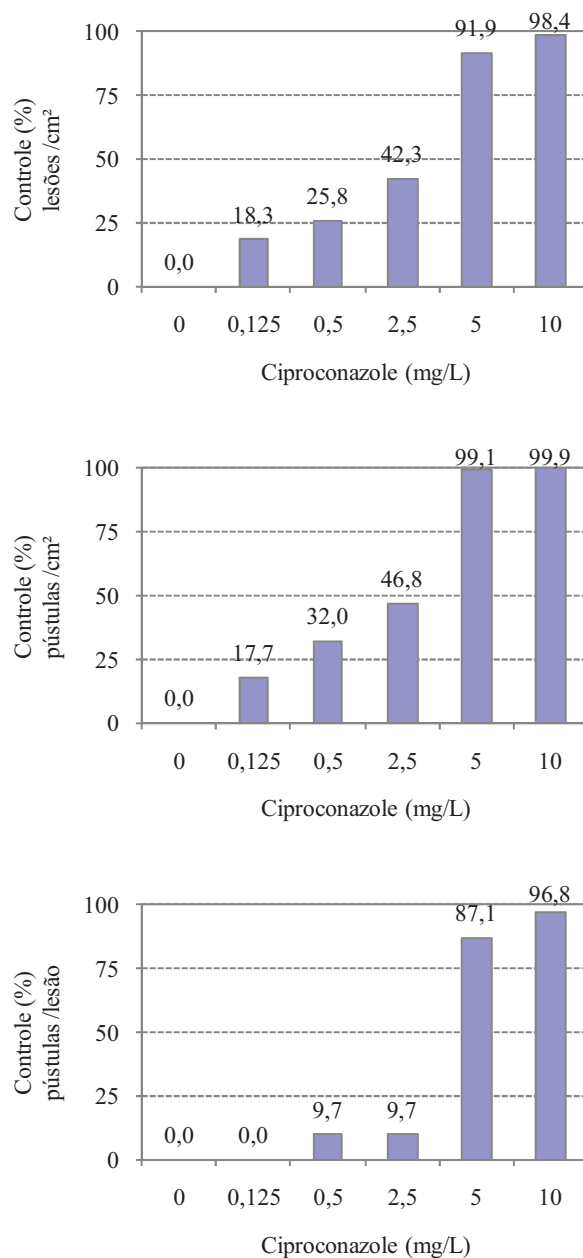


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida ciproconazol, no experimento 2

APÊNDICE F - Fungicida Epoxiconazol

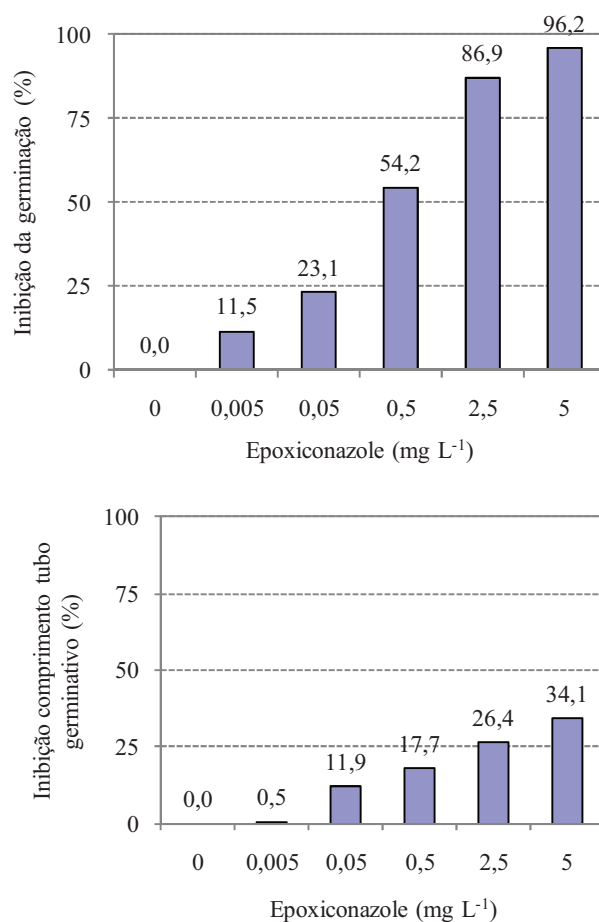


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida epoxiconazol no experimento 1

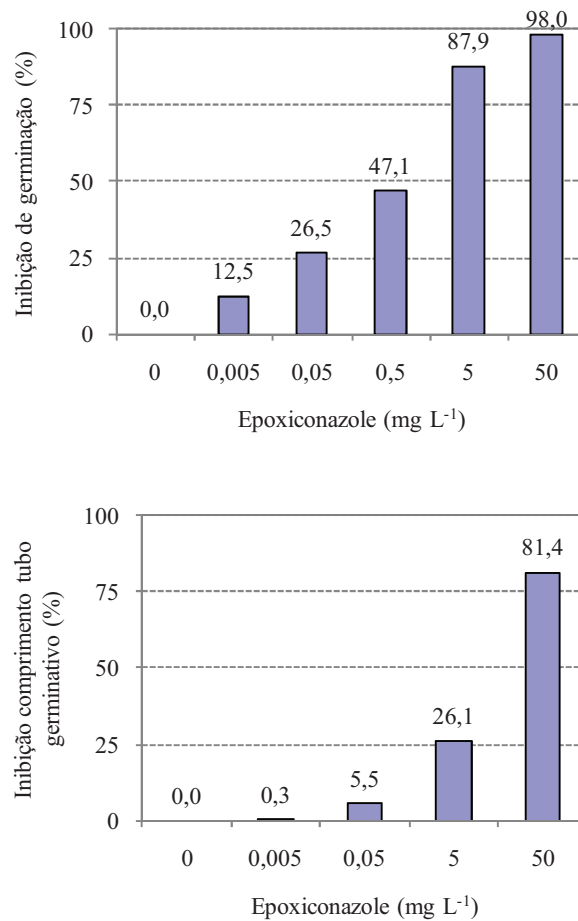


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida epoxiconazol no experimento 2

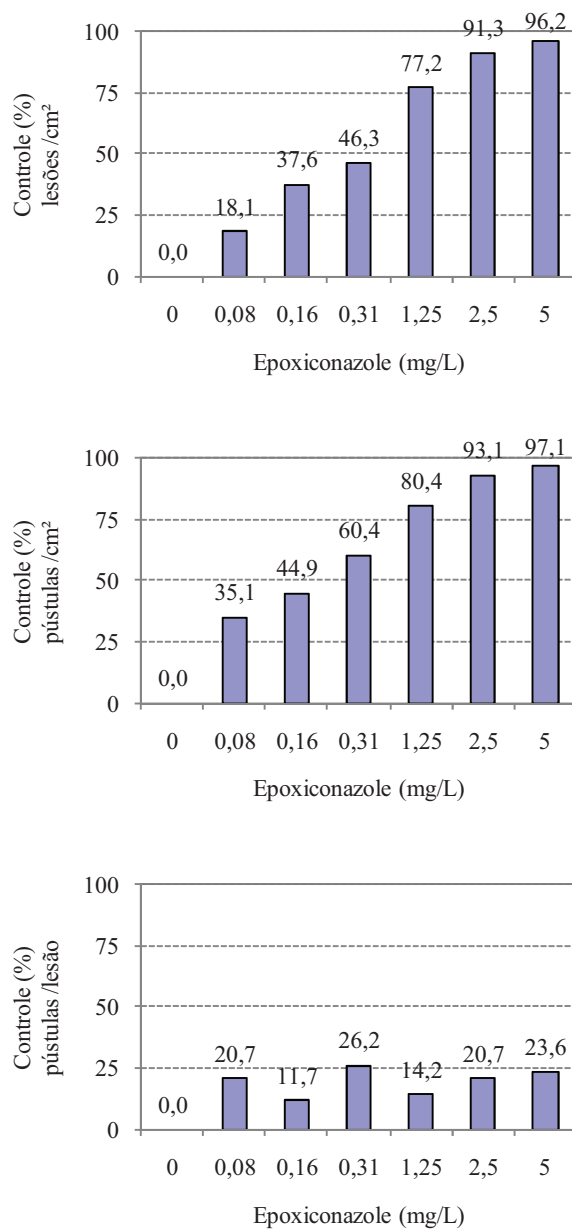


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida epoxiconazol, no experimento 1

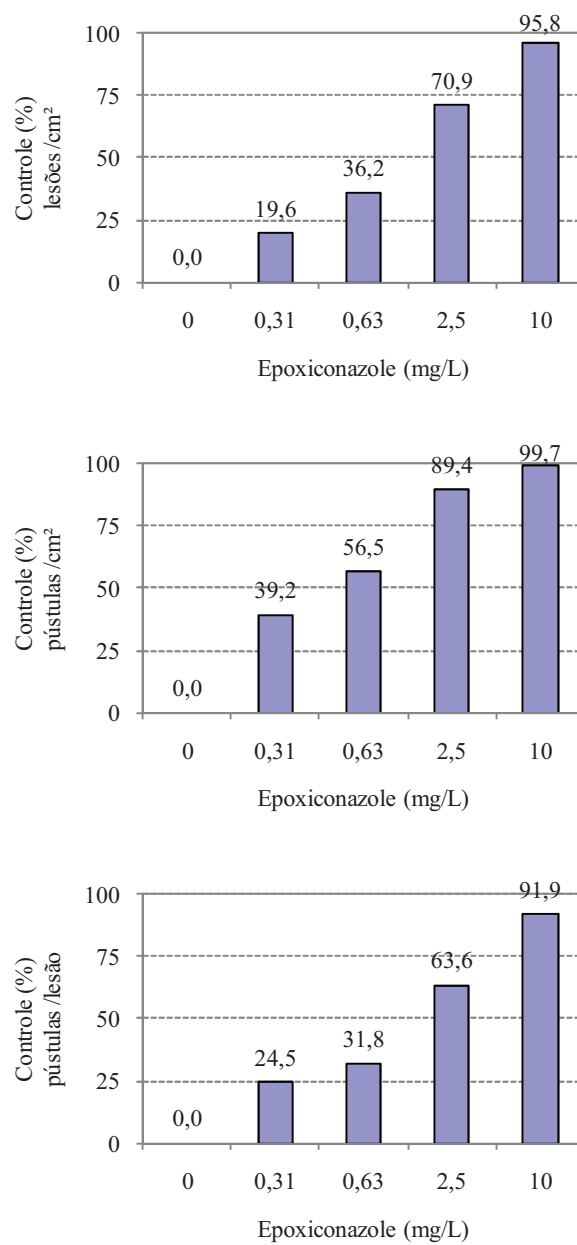


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida epoxiconazol, no experimento 2

APÊNDICE G - Fungicida Flutriafol

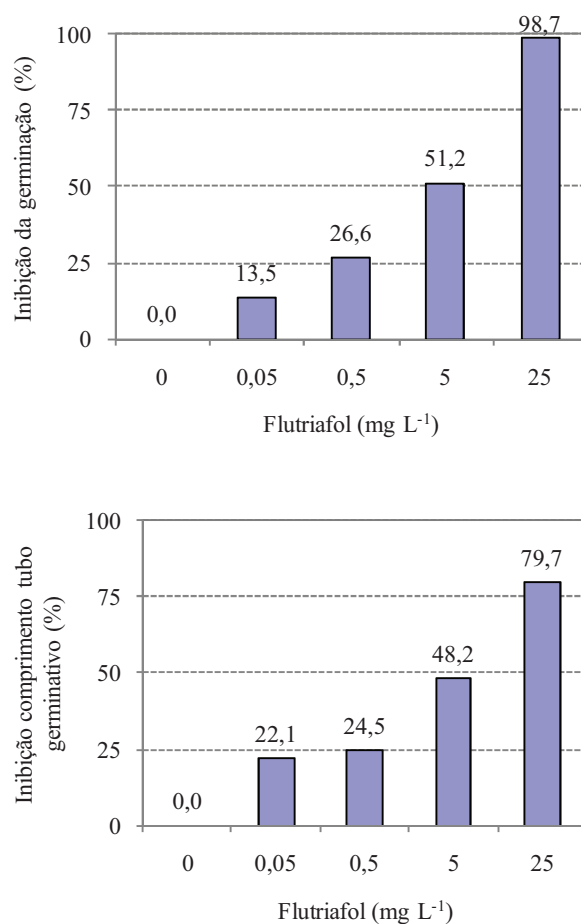


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida flutriafol no experimento 1

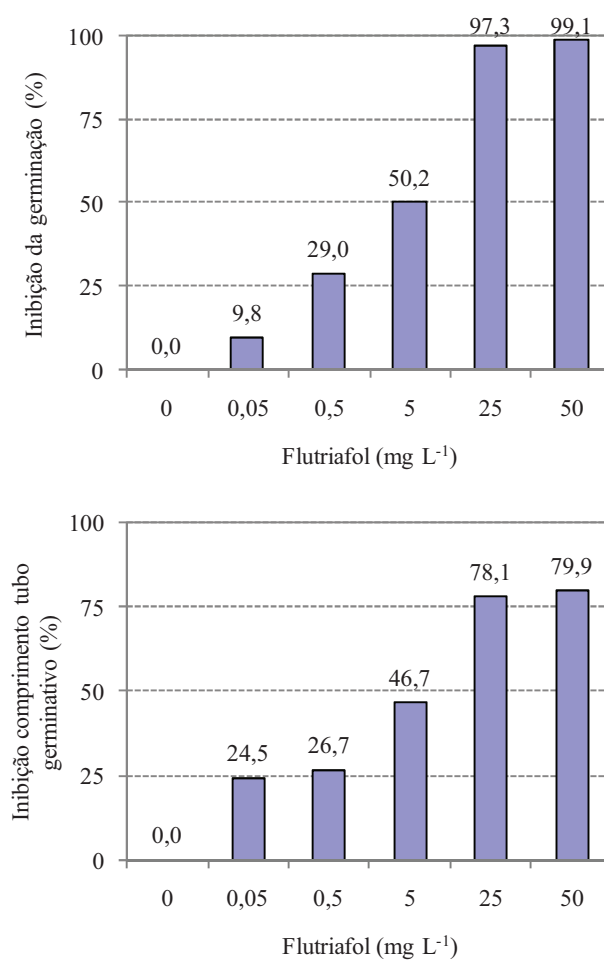


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida flutriafol no experimento 2

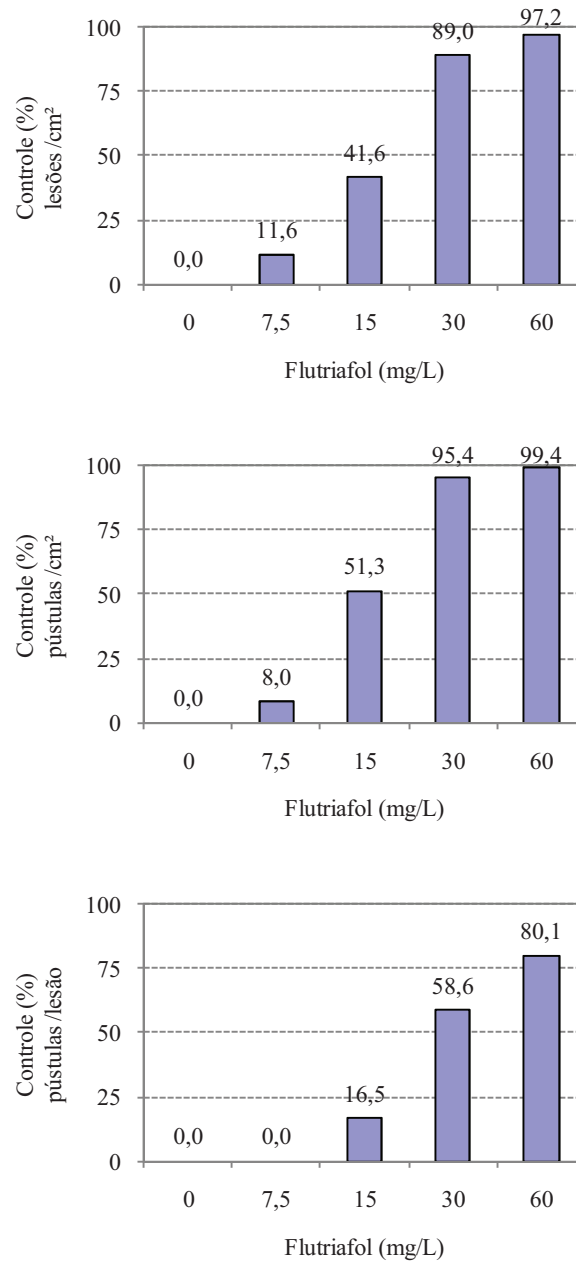


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida flutriafol, no experimento 1

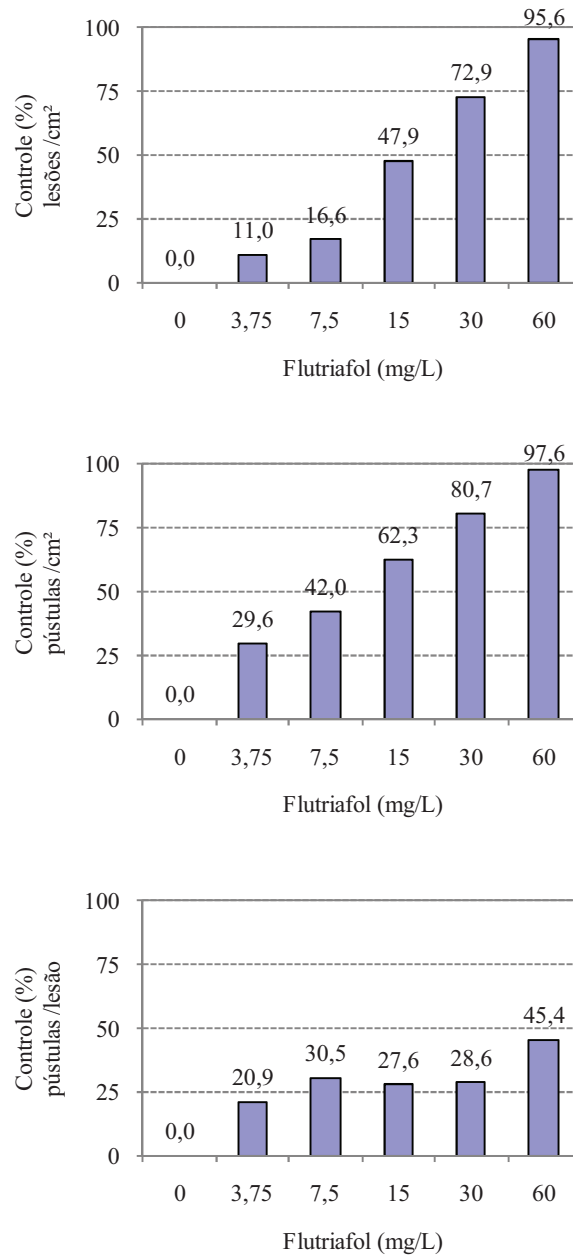


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida flutriafol, no experimento 2

APÊNDICE H - Fungicida Metconazol

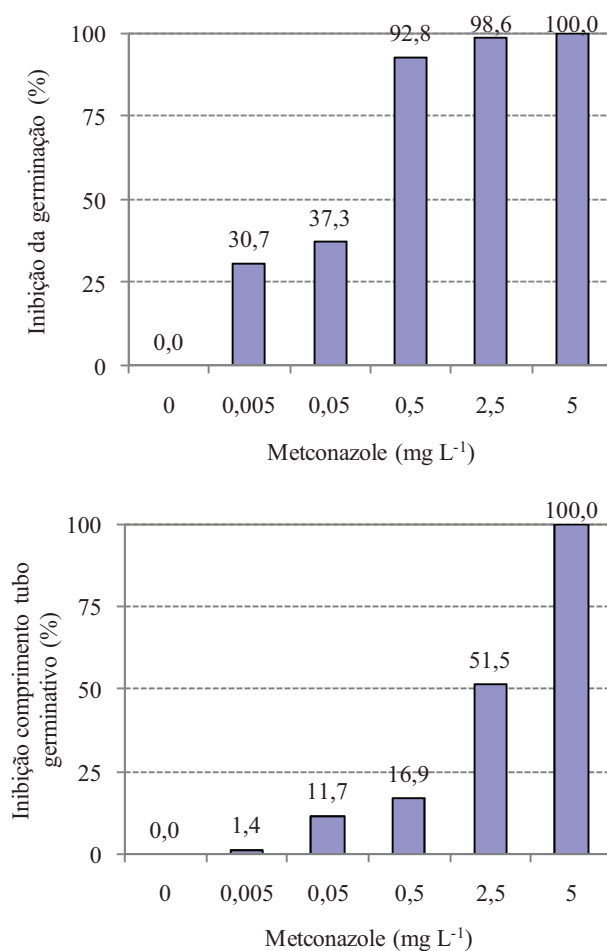


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida metconazol no experimento 1

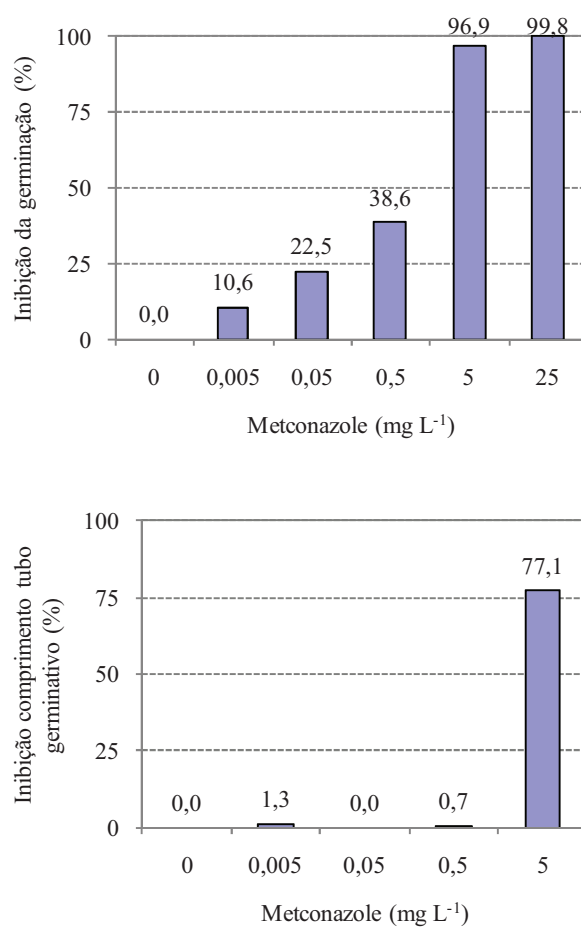


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida metconazol no experimento 2

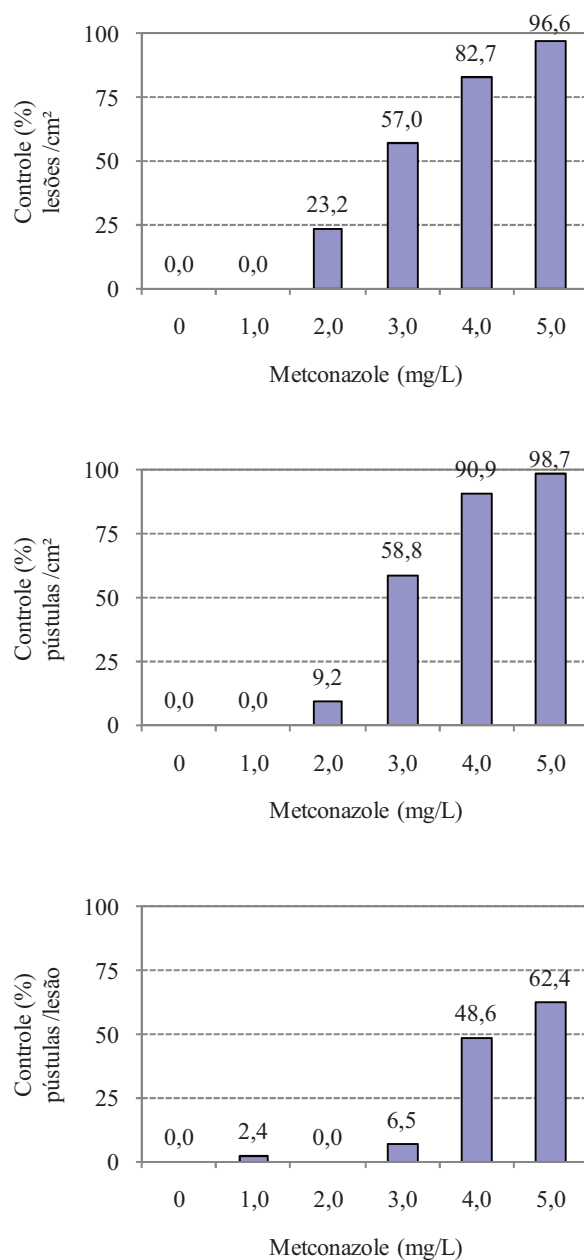


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida metconazol, no experimento 1

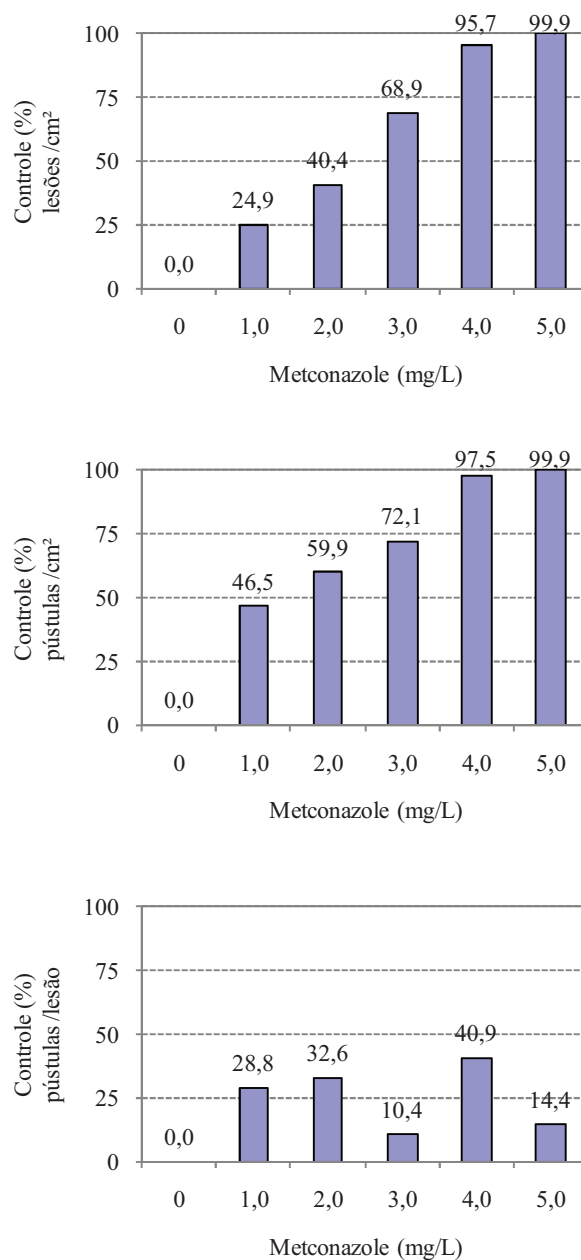


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida metconazol, no experimento 2

APÊNDICE I - Fungicida Miclobutanil

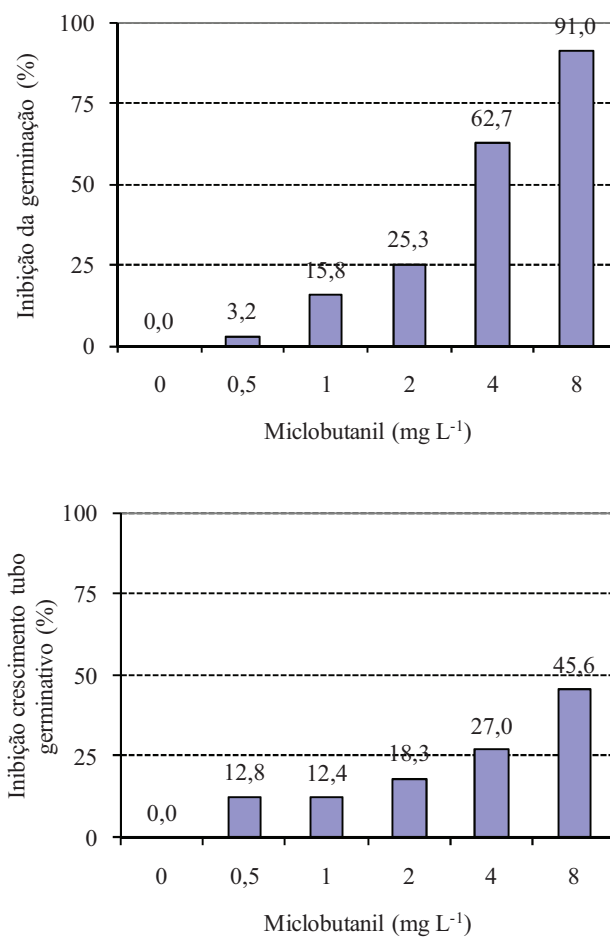


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida miclobutanil no experimento 1

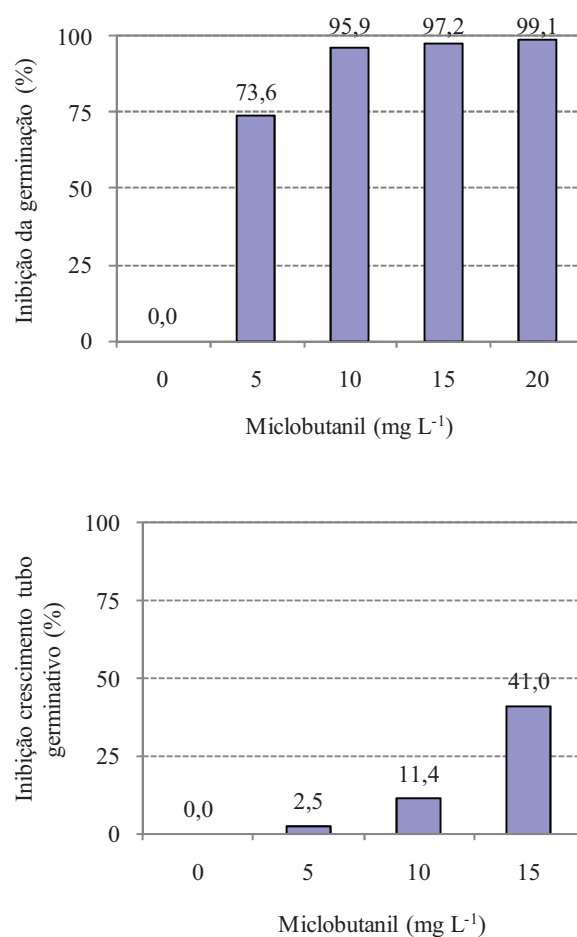


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida miclobutanil no experimento 2

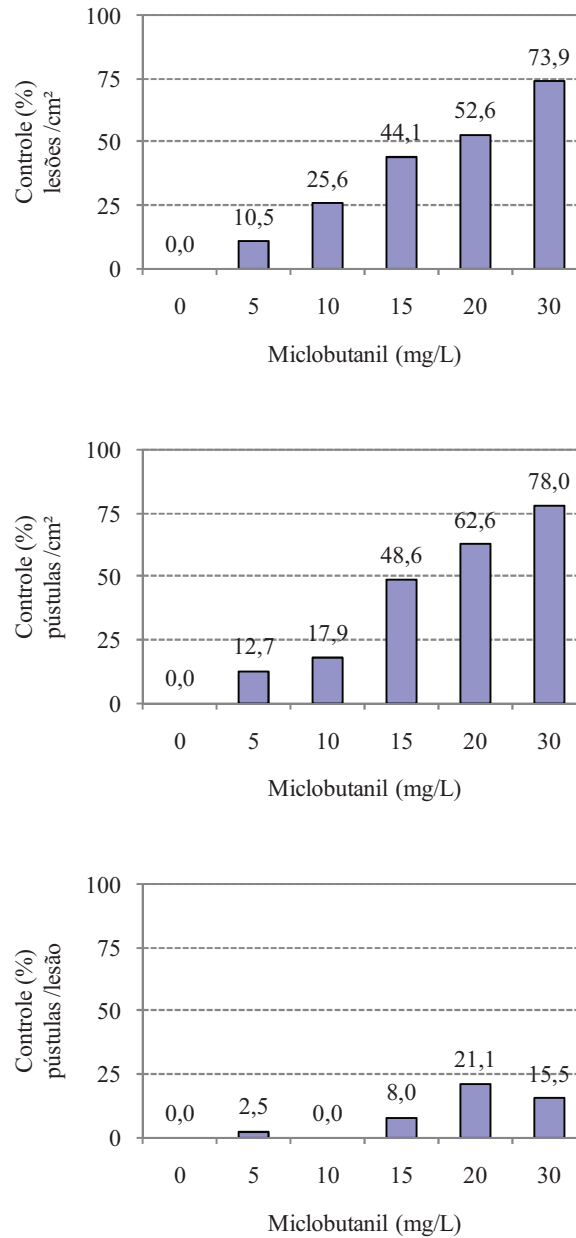


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida miclobutanil, no experimento 1

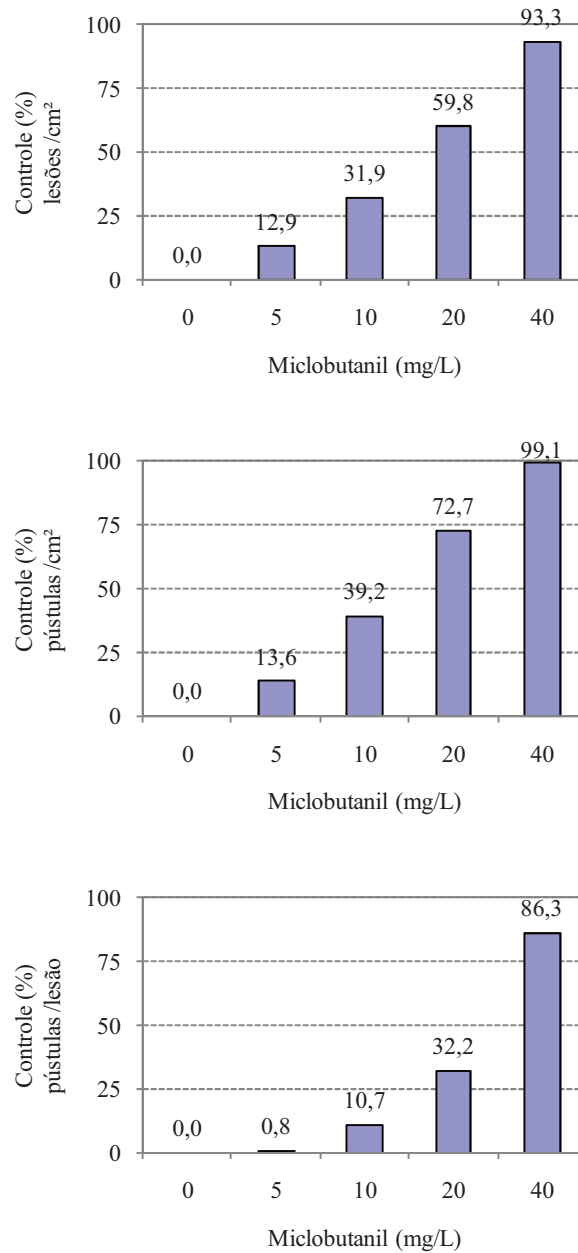


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida miclobutanil, no experimento 2

APÊNDICE J - Fungicida Tebuconazol

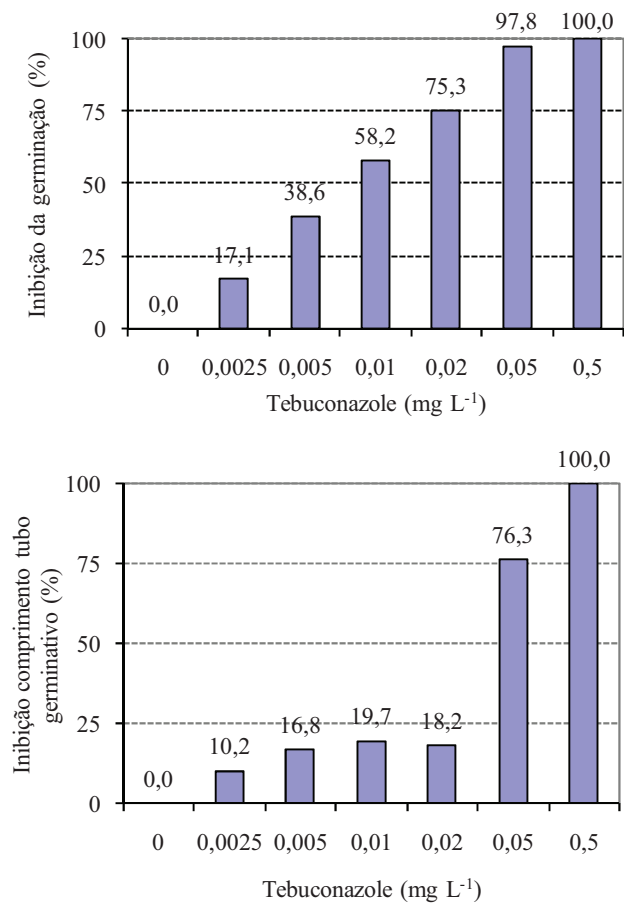


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida tebuconazol no experimento 1

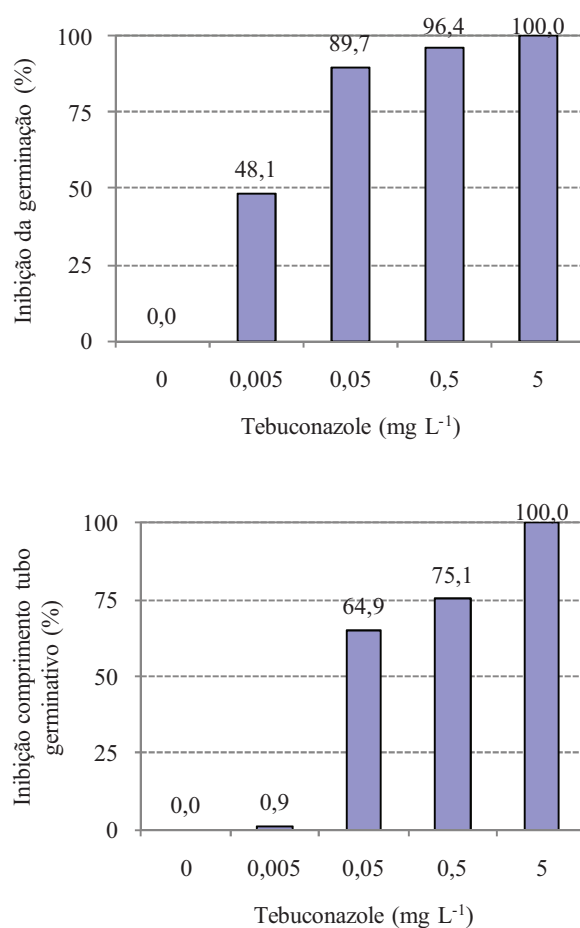


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida tebuconazol no experimento 2

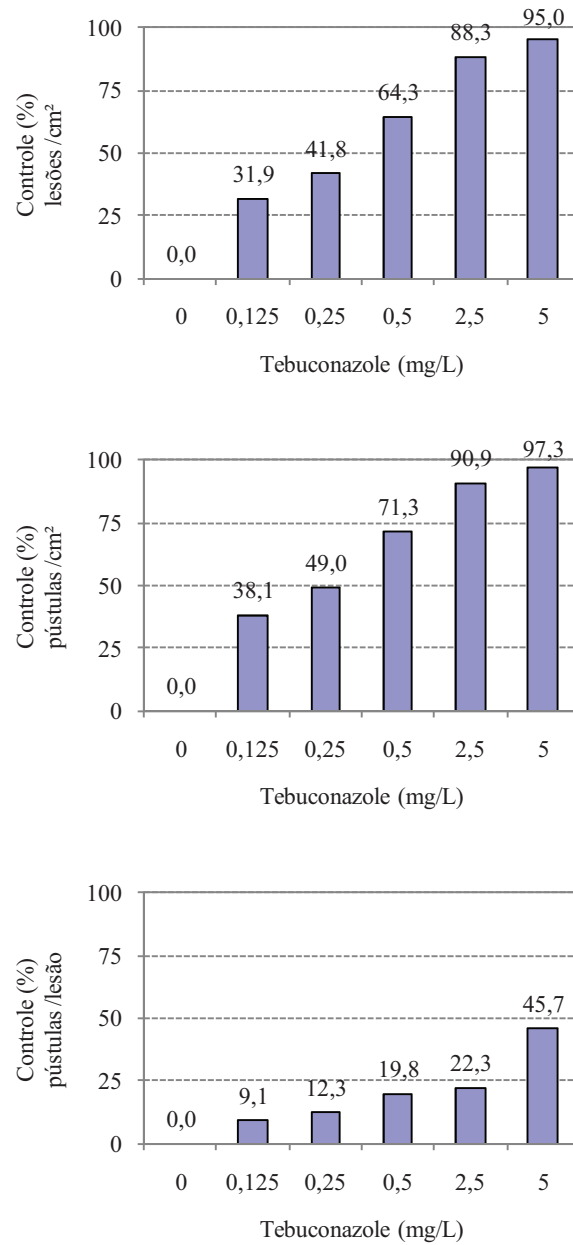


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida tebuconazol, no experimento 1

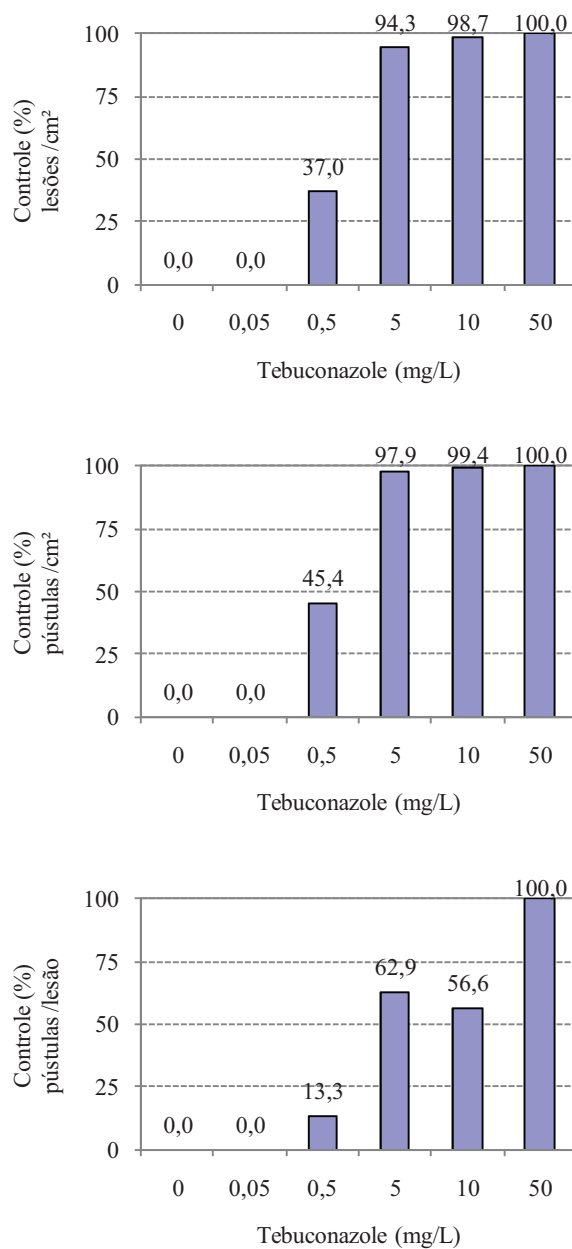


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida tebuconazol, no experimento 2

APÊNDICE K - Fungicida Tetraconazol

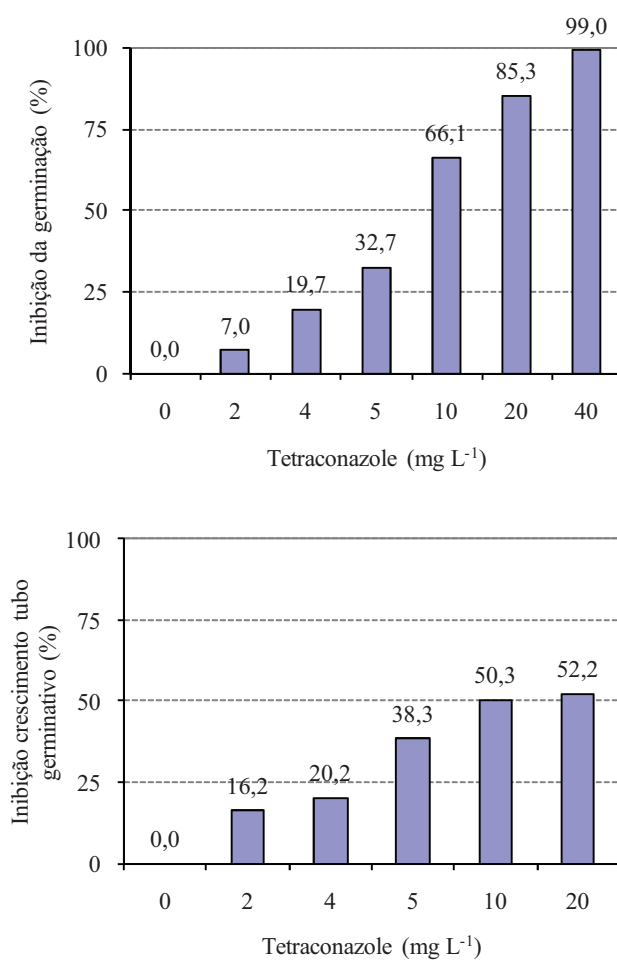


Figura 1. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida tetraconazol no experimento 1

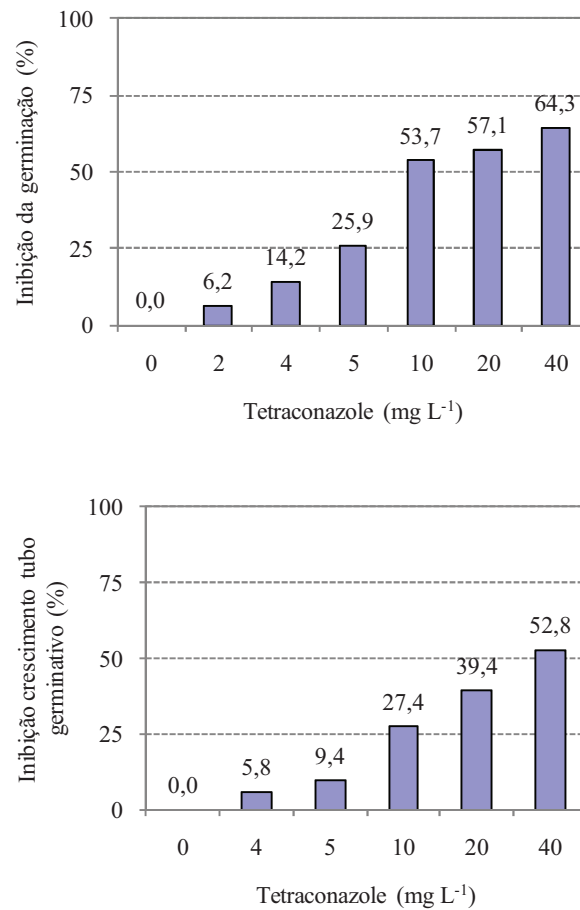


Figura 2. Inibição da germinação e do crescimento do tubo germinativo de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, *in vitro* (ágar-água; 22 °C; tempo de exposição de 6 h; ausência de luz), em diferentes concentrações do fungicida tetraconazol no experimento 2

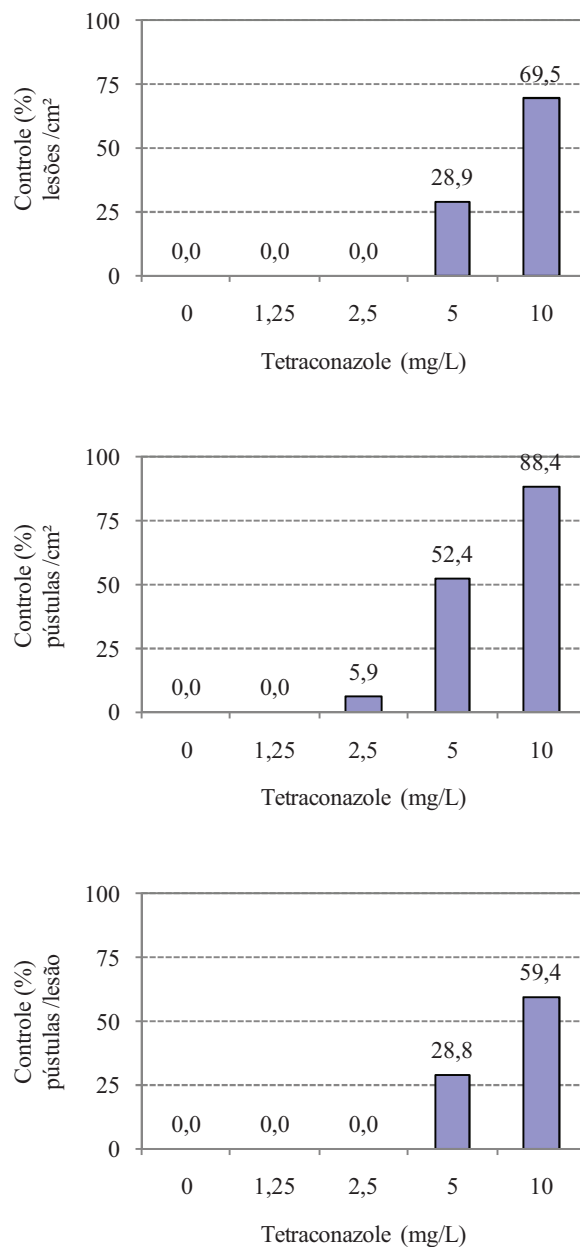


Figura 3. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida tetraconazol, no experimento 1

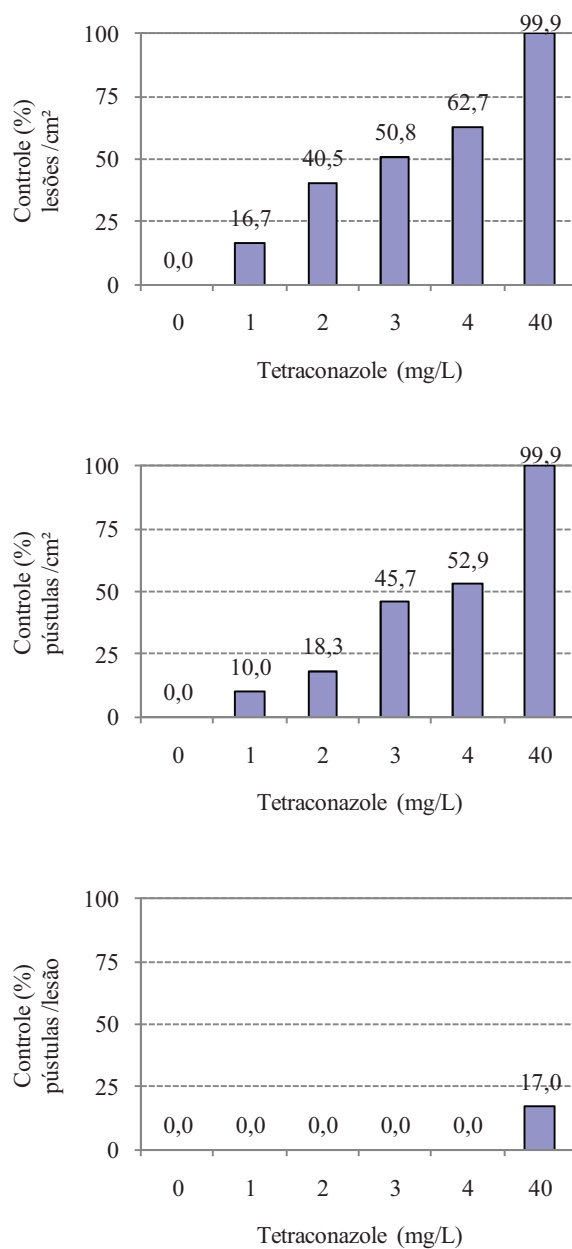


Figura 4. Controle do número de lesões, pústulas e pústulas por lesão de *Phakopsora pachyrhizi*, em folíolos de soja destacados, para o fungicida tetraconazol, no experimento 2