

## ARTIGO ORIGINAL

### Monitoramento da sensibilidade de *Corynespora cassiicola* aos fungicidas bixafem e fluxapiróxade

Helen Prudente Vasconcelos<sup>1</sup> , Ivani de Oliveira Negrão Lopes<sup>2</sup> , Claudine Dinali Santos Seixas<sup>2</sup> ,  
Marcelo Giovanetti Canteri<sup>1</sup> ; Cláudia Vieira Godoy<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, PR-445, Km 380, Campus Universitário, CEP: 86057-970 Londrina, PR, Brasil;

<sup>2</sup>Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, s/n, acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta, CP: 4006, CEP: 86085-981, Londrina, PR, Brasil

Autor para correspondência: Helen Prudente Vasconcelos (helen\_08.02@hotmail.com)

Data de recebimento: 04/12/2023. Data de aceite: 01/05/2024

10.1590/0100-5405/281083

#### RESUMO

Vasconcelos, H.P.; Lopes, I. de O.N.; Seixas, C.D.S.; Canteri, M.G.; Godoy, C.V. Monitoramento da sensibilidade de *Corynespora cassiicola* aos fungicidas bixafem e fluxapiróxade. *Summa Phytopathologica*, v.50, p.1-6, 2024.

A mancha-alvo na cultura da soja, causado pelo fungo *Corynespora cassiicola*, pode ser controlada pelo uso de cultivares menos sensíveis ao fungo, pela rotação de culturas e pela aplicação de fungicidas. O grupo mais recente de fungicidas sítio-específicos registrados são os inibidores da succinato desidrogenase (ISDH). No entanto, aplicações excessivas de fungicidas sítio-específicos podem contribuir para a seleção de populações menos sensíveis. Este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade de 54 isolados de *C. cassiicola* aos fungicidas ISDH, bixafem e fluxapiróxade. Isolados de *C. cassiicola* foram obtidos de folhas de soja (n=53) e de algodão (n=1), coletadas em cinco regiões produtoras de soja no Brasil (MT, PR, GO MS e

MA), de 2014 a 2018. Para determinar a concentração efetiva para redução de 50% do crescimento micelial ( $CE_{50}$ ) foi utilizada o método da microtitulação colorimétrica. Os valores de  $CE_{50}$  variaram de 0,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 37,80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para bixafem e de <0,0125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 44,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para fluxapiróxade, indicando a ocorrência de isolados de *C. cassiicola* com menor sensibilidade aos fungicidas avaliados. Isolados com maior e menor sensibilidade foram encontrados no mesmo local de coleta, sendo importante a adoção de estratégias antirresistência, limitando o número de aplicações do mesmo grupo químico e associando os fungicidas sítio-específicos a fungicidas multissítios para evitar o aumento de populações menos sensíveis.

**Palavras-chave:** controle químico, mancha-alvo, carboxamida, resistência

#### ABSTRACT

Vasconcelos, H.P.; Lopes, I. de O.N.; Seixas, C.D.S.; Canteri, M.G.; Godoy, C.V. Sensitivity monitoring of *Corynespora cassiicola* to bixafen and fluxapyroxad fungicides. *Summa Phytopathologica*, v.50, p.1-6, 2024.

Soybean target spot, caused by the fungus *Corynespora cassiicola*, can be controlled by using cultivars less susceptible to the fungus, crop rotation and fungicide applications. The most recently registered group of site-specific fungicides are succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI). However, excessive use of these site-specific fungicides can contribute to the selection of less sensitive populations. The present study aimed to assess the sensitivity of 54 *C. cassiicola* isolates to the SDHI fungicides bixafen and fluxapyroxad. The isolates were obtained from soybean (n=53) and cotton (n=1) leaves collected in five soybean-producing regions in Brazil (MT, PR, GO, MS and MA) from

2014 to 2018. The half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) was determined by using the colorimetric microtiter plate assay. The  $EC_{50}$  values ranged from 0.02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to 37.80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for bixafen and <0.0125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to 44.40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for fluxapyroxad, indicating the presence of *C. cassiicola* isolates with lower sensitivity to the tested fungicides. Isolates with higher and lower sensitivity were found in the same location, emphasizing the importance of adopting anti-resistance strategies, such as limiting the number of applications of one same chemical group and combining site-specific with multi-site fungicides to prevent the increase in less sensitive populations.

**Keywords:** chemical control, target spot, carboxamide, resistanc

*Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei infecta mais de 400 espécies de plantas em 61 países, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas (3, 20). O fungo pode ser

encontrado em folhas, caules e raízes de plantas e cistos de nematoides (3). Na cultura da soja, o fungo causa a doença conhecida como mancha-alvo. Os sintomas típicos são observados nas folhas, iniciando

por pontuações pardas, com halo amarelado, evoluindo para manchas circulares, de coloração castanho-clara a castanho-escuro. Dependendo da reação da cultivar, as lesões podem atingir até 2 cm de diâmetro ou permanecer pequenas (1 mm a 3 mm), mas em maior número. Normalmente, as manchas apresentam pontuação no centro e anéis concêntricos de coloração mais escura, podendo também ocorrer manchas em pecíolos, hastes e vagens (7). O crescimento do fungo em meio de cultura é favorecido por temperaturas entre 18 °C – 21 °C, sendo que alguns isolados apresentam crescimento ótimo a 28 °C (7). A doença é favorecida chuvas bem distribuídas (7). O dano ocorre pela desfolha precoce. Cultivares suscetíveis podem apresentar perdas de até 40% de produtividade (4).

As estratégias de manejo recomendadas para essa doença são a utilização de cultivares resistentes ou tolerantes, o tratamento de sementes, a rotação ou sucessão de culturas com milho e outras espécies de gramíneas e o controle químico com fungicidas (7).

No Brasil, o uso de fungicidas na cultura da soja foi intensificado após a introdução da ferrugem-asiática da soja. Esse uso intensivo de fungicidas na cultura tem selecionado populações de fungos menos sensíveis aos diferentes grupos de fungicidas sítio-específicos (6, 10, 14, 17). Para *C. cassiicola*, a resistência aos fungicidas inibidores de quinona externa (IQe) vem sendo relatada desde 2014 nas principais regiões produtoras de soja no Brasil, em número significativo de amostras, em razão da presença da mutação G143A, que confere resistência completa (6, 12).

Fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (ISDH) foram descritos pela primeira vez há mais de 50 anos. Em contraste com a primeira geração de fungicidas ISDH que apresentava limitado espectro de ação, novos ingredientes ativos nessa classe, como boscalida, fluopiram e fluxapiraxade apresentam atividade contra várias espécies de fungos (2, 16). Os fungicidas ISDH interrompem a respiração fúngica, bloqueando o transporte de elétrons do grupo heme para ubiquinona. A enzima SDH consiste em quatro subunidades, A, B, C e D. A resistência aos fungicidas ISDH é multi-monogênica, sendo descritas várias mutações nas subunidades sdhB, sdhC e sdhD, dentro ou perto do local de ligação da ubiquinona. Embora existam homólogos dos alelos de resistência entre espécies de fungos, estes podem estar associados a diferentes fatores de resistência aos compostos nas diferentes espécies (2, 16). Nem sempre é observada resistência cruzada completa entre ingredientes ativos do grupo ISDH (11).

Os fungicidas ISDH são eficientes contra vários fungos patogênicos, incluindo *C. cassiicola* (9). Em uma meta-análise conduzida com experimentos cooperativos realizados em diferentes regiões do Brasil de 2012 a 2016 na cultura da soja, as misturas de fluxapiraxade + piraclostrobina e epoxiconazol + fluxapiraxade + piraclostrobina apresentaram eficiência de controle para mancha-alvo de 76,2% e 75,7%, respectivamente (5). No entanto, os programas de monitoramento realizados no Brasil detectaram a partir de 2018 a presença das mutações C-N75S e B-H278Y em isolados com sensibilidade reduzida aos fungicidas ISDH, com aumento significativo da C-N75S e decréscimo da B-H278Y em 2022. Outras mutações foram detectadas em isolados incluindo sdh B-H278R, B-I280V e D-V152I (6).

Métodos rápidos de detecção são essenciais para evitar o uso de fungicidas com baixa eficiência. Um método rápido é a avaliação por meio de microtitulação colorimétrica (18, 19), no qual o fungo é adicionado a poços de uma microplaca contendo fungicidas em diferentes concentrações e seu crescimento é avaliado com espectrofotômetro. A microtitulação colorimétrica permite medir de

forma automática em leitor de microplacas o aumento da biomassa fúngica na presença do fungicida, facilitando assim a avaliação de um grande número de isolados simultaneamente. Esse método tem se mostrado eficiente na avaliação de isolados de *C. cassiicola* em relação aos grupos de fungicidas metil benzimidazol carbamatos (MBC), IQe e inibidores da desmetilação (IDM), conforme demonstrado no trabalho de Xavier et al. (21).

Neste estudo, o objetivo foi avaliar a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* obtidos de folhas de plantas de soja e de algodão coletadas em diferentes regiões produtoras aos fungicidas bixafem e fluxapiraxade (ISDH), utilizando o método de microtitulação colorimétrica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados foram obtidos a partir de folíolos de soja e um isolado de folha de algodão (CMES 1980) com sintomas de mancha-alvo, provenientes de plantas coletadas em diferentes regiões produtoras em 2014 (n=1), 2016 (n=1) e 2018 (n=50) (Tabela 1). Os isolados pertencem à Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES). No total, foram utilizados 54 isolados de *C. cassiicola*, coletados em cinco estados brasileiros Brasil (MT, PR, GO MS e MA - Tabela 1). Dois desses isolados foram obtidos em 1997 e 1998, antes do uso frequente de fungicidas na cultura da soja (Tabela 1). Os isolados, preservados segundo o método de Castellani, foram repicados para placas contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos em câmara de crescimento (BOD) a 25 °C por sete dias.

Foram utilizados os ingredientes ativos fluxapiraxade (100 g i.a. L<sup>-1</sup>) e bixafem (125 g i.a. L<sup>-1</sup>) fornecidos pelas empresas BASF e Bayer, respectivamente, para avaliar a sensibilidade de *C. cassiicola* aos fungicidas ISDH, utilizando o método de microtitulação colorimétrica. Apesar de existirem mais ingredientes ativos do grupo dos ISDH com registro na cultura da soja, não se conseguiu obter amostras dos mesmos para os testes.

Para a instalação dos experimentos, os isolados de *C. cassiicola* foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA, por 10 dias a 25°C, em fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro, em BOD. Após 10 dias, 8 mL de meio de cultura Yeast Bacto Acetate (YBA) (10 g de extrato de levedura, 10 g de bacto peptona, 20 g de acetato de sódio colocados em 500 mL de água destilada e autoclavados) foram adicionados à colônia fúngica. Em seguida, o micélio foi raspado com lâmina de vidro estéril para coletar os esporos de *C. cassiicola*. A suspensão de esporos obtida foi filtrada em gaze esterilizada e a concentração ajustada para 10<sup>5</sup> esporos mL<sup>-1</sup> utilizando hemocitômetro.

Para determinar a sensibilidade dos isolados aos fungicidas foram utilizadas microplacas de poliestireno esterilizadas de 96 poços (Kasvi). Nas microplacas, foram adicionados os fungicidas fluxapiraxade e bixafem nas concentrações de 0; 0,0125; 0,05; 0,2; 0,8; 20; 40 e 100 µg mL<sup>-1</sup>. Os fungicidas foram previamente preparados em solução estoque com água esterilizada na concentração de 300 µg mL<sup>-1</sup>, com diluições seriadas até a obtenção das concentrações finais.

Foram adicionados 50 µL da suspensão de 10<sup>5</sup> esporos mL<sup>-1</sup> em cada poço da microplaca, seguido da adição de 50 µL das diferentes concentrações dos fungicidas, num volume final de 100 µL. As concentrações finais dos fungicidas após a adição da suspensão foram de 0; 0,00625; 0,025; 0,1; 0,4; 10; 20 e 50 µg mL<sup>-1</sup>. As concentrações foram distribuídas em linhas (8 concentrações) e os isolados em colunas, sendo realizadas 4 repetições por isolado (4 colunas). Em cada microplaca

**Tabela 1.** Códigos de identificação dos isolados de *Corynespora cassiicola* presentes na Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES), ano e local de coleta, concentração efetiva para inibir 50% do crescimento ( $CE_{50} - \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de microtitulação colorimétrica para bixafem e fluxapiroxade.

<b>Código do isolado</b>	<b>Ano</b>	<b>Município, Estado</b>	<b>bixafem</b>	<b>fluxapiroxade</b>
CMES 312	1997	Itiquira, MT	0,11	0,75
CMES 313	1998	Nova Mutum, MT	0,02	0,69
CMES 1474	2014	Sinop, MT	3,7	5,7
CMES 1736	2016	Tangará da Serra, MT	15,8	22,5
CMES 1980	2018	Rio Verde, GO	33,8	4,3
CMES 1984	2018	Maracaju, MS	0,82	4,4
CMES 1985	2018	Maracaju, MS	0,12	1,5
CMES 1986	2018	Maracaju, MS	0,28	0,34
CMES 1988	2018	Campo Novo do Parecis, MT	0,27	<0,00625
CMES 1991	2018	Campo Novo do Parecis, MT	0,34	0,35
CMES 2000	2018	Campo Novo do Parecis, MT	0,35	0,34
CMES 2002	2018	Campo Mourão, PR	6,9	0,62
CMES 2004	2018	Bela Vista do Paraíso, PR	4,1	0,79
CMES 2005	2018	Bela Vista do Paraíso, PR	0,79	14
CMES 2007	2018	Bela Vista do Paraíso, PR	0,82	2,3
CMES 2011	2018	Lucas do Rio Verde, MT	0,71	0,19
CMES 2012	2018	Lucas do Rio Verde, MT	3,3	0,42
CMES 2013	2018	Primavera do Leste, MT	0,05	<0,00625
CMES 2014	2018	Primavera do Leste, MT	24,1	21,7
CMES 2015	2018	Primavera do Leste, MT	0,23	0,47
CMES 2016	2018	Primavera do Leste, MT	1,2	1,4
CMES 2017	2018	Primavera do Leste, MT	0,03	8,3
CMES 2018	2018	Primavera do Leste, MT	0,27	0,37
CMES 2024	2018	Primavera do Leste, MT	11,8	0,8
CMES 2025	2018	Primavera do Leste, MT	1,3	1,1
CMES 2026	2018	Primavera do Leste, MT	0,91	0,66
CMES 2027	2018	Primavera do Leste, MT	0,18	0,63
CMES 2029	2018	Diamantino, MT	21,7	23,3
CMES 2030	2018	Diamantino, MT	0,46	0,35
CMES 2031	2018	Diamantino, MT	30,8	25,9
CMES 2032	2018	Diamantino, MT	8,6	20,6
CMES 2035	2018	Diamantino, MT	30,2	30,1
CMES 2036	2018	Campo Mourão, PR	0,06	0,19
CMES 2037	2018	Campo Mourão, PR	0,75	0,75
CMES 2038	2018	Campo Mourão, PR	0,2	0,58
CMES 2039	2018	Campo Mourão, PR	0,32	0,81

**Tabela 1.** Continuação

Código do isolado	Ano	Município, Estado	bixafem	fluxapiroxade
CMES 2040	2018	Campo Mourão, PR	0,35	0,41
CMES 2041	2018	Itambé, PR	37,8	11,8
CMES 2044	2018	Doutor Camargo, PR	0,49	0,34
CMES 2045	2018	Doutor Camargo, PR	0,58	0,4
CMES 2046	2018	Doutor Camargo, PR	0,27	<0,00625
CMES 2047	2018	Doutor Camargo, PR	0,92	0,42
CMES 2053	2018	Chapadão do Sul, MS	3,9	1,7
CMES 2064	2018	Santa Fé, PR	0,99	2,2
CMES 2066	2018	Rolândia, PR	1,1	0,83
CMES 2072	2018	Rolândia, PR	3,5	<0,00625
CMES 2075	2018	Londrina, PR	0,39	0,38
CMES 2078	2018	Londrina, PR	3,2	44,4
CMES 2080	2018	Londrina, PR	26,9	38,3
CMES 2083	2018	Rondonópolis, MT	1,6	0,28
CMES 2084	2018	Bela Vista do Paraíso, PR	1	0,99
CMES 2085	2018	Bela Vista do Paraíso, PR	0,07	<0,00625
CMES 2086	2018	Bela Vista do Paraíso, PR	0,39	0,18
CMES 2088	2018	Tasso Fragoso, MA	1,2	0,98

foi deixada uma testemunha (meio de cultura YBA + fungicida). As microplacas foram tampadas e envoltas por filme plástico, sendo em seguida colocadas em mesa agitadora a 150 rpm por uma hora, para permitir a mistura dos fungicidas com os esporos. Posteriormente, as microplacas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 25°C, com fotoperíodo de 12/12 horas, durante um período de sete dias. Após esse período, a absorbância foi medida em leitor de microplacas (ASYS, Eugendorf, Áustria) no comprimento de onda de 540 nm. O valor da absorbância final foi calculado pela subtração da absorbância da amostra na testemunha (meio de cultura YBA + fungicida) da absorbância dos isolados com as doses dos fungicidas. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

Para estimar as concentrações que inibiram o crescimento fúngico em 50% ( $CE_{50}$ ), foram considerados apenas os dados de isolados que apresentaram inibição de crescimento menor que 100% em pelo menos quatro concentrações crescentes dos fungicidas. Os isolados que não apresentaram crescimento micelial após uma das quatro primeiras doses foram considerados sensíveis. Para os isolados CMES 1736, CMES 1984, CMES 1985, CMES 1986, CMES 1991, CMES 2002, CMES 2017, CMES 2027, CMES 2036, CMES 2038, CMES 2041, CMES 2045, CMES 2046, CMES 2047, CMES 2061, CMES 2064, CMES 2072, CMES 2078, CMES 2080 e CMES 2084 foi considerada somente uma das repetições para estimativa da  $CE_{50}$  pela falta de ajuste dos dados aos modelos em uma das repetições.

Os modelos de regressão não-linear probit, logit, Weibull 1 e Weibull 2 foram ajustados para identificar qual modelo melhor representava a relação entre as concentrações de cada fungicida e a

absorbância. Quando as estimativas de  $CE_{50}$  obtidas por diferentes modelos apresentavam divergências, análises gráficas dos resíduos foram realizadas para auxiliar na escolha do modelo final. Todas as análises foram conduzidas no ambiente R, utilizando o pacote drc (13).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os isolados coletados em 1997 (CMES 312) e 1998 (CMES 313), os valores de  $CE_{50}$  foram de 0,11  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para bixafem e 0,75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0,69  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para fluxapiroxade, respectivamente, mostrando sensibilidade aos dois ingredientes ativos. A  $CE_{50}$  estimada dos isolados coletados a partir de 2014 variou de 0,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 37,80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para bixafem e <0,0125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 44,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para fluxapiroxade (Tabela 1). Para o fungicida bixafem 55,7% dos isolados apresentaram  $CE_{50}$  abaixo de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 15,3% dos isolados acima de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o fungicida fluxapiroxade 61,5% dos isolados apresentaram  $CE_{50}$  abaixo de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 17,3% dos isolados acima de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 1). Nenhum dos isolados apresentou crescimento em concentração acima de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os isolados CMES 1736, CMES 2014, CMES 2029, CMES 2031, CMES 2035, CMES 2041 e CMES 2080 apresentaram valores de  $CE_{50} > 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os dois ingredientes ativos. Os isolados CMES 1980 e CMES 2024 apresentaram valores de  $CE_{50} > 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  apenas para bixafem e os isolados CMES 2005 e CMES 2078 valores de  $CE_{50} > 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  apenas para fluxapiroxade. Padrões diferentes de sensibilidade também foram observados por Mackenzie (11) ao avaliar

a sensibilidade de 85 isolados de *C. cassiicola* obtidos de plantas de tomate a boscalida, pentiopirade, fluxapiraxade, benzovindiflupir e fluopiram, não sendo observada resistência cruzada completa entre os diferentes ISDHs. A resistência cruzada dos isolados aos fungicidas foi observada para benzovindiflupir e fluxapiraxade, assim como pentiopirade e fluxapiraxade, e também pentiopirade e benzovindiflupir. Para fluopiram não foi observada resistência cruzada com nenhum dos fungicidas avaliados. Boscalida apresentou a maior frequência de isolados com menor sensibilidade (79%) com elevada resistência cruzada com pentiopirade (73%).

A redução de sensibilidade a diferentes fungicidas do grupo ISDH pode ocorrer pela natureza intrínseca do fungicida ou em razão das diferentes mutações no genoma do fungo (9, 15). Isolados de *C. cassiicola* com as mutações B-I280V ou B-H278Y exibiram fenótipos de resistência significativamente distintos. O isolado com a mutação B-I280V demonstrou resistência moderada ao fluopiram e baixa resistência à boscalida, enquanto o isolado com a mutação B-H278Y foi sensível ao fluopiram e altamente resistente à boscalida (15).

A redução da eficiência de fungicidas ISDH tem sido observada nos últimos anos em ensaios a campo no Brasil, apresentando variações entre as regiões (8). Neste estudo, foi possível observar diferentes níveis de sensibilidade entre os isolados obtidos de folhas de soja coletadas na mesma lavoura, como nos casos de Primavera do Leste, Diamantino e Londrina. Os programas de monitoramento realizados no Brasil detectaram a partir de 2018 a presença das mutações C-N75S e B-H278Y em isolados com sensibilidade reduzida aos fungicidas, com aumento significativo da C-N75S e decréscimo da B-H278Y em 2022 (6). No Brasil, os fungicidas ISDH fluxapiraxade, bixafem, benzovindiflupir, pidiflumetofen, impirfluxam e boscalida possuem registro para *C. cassiicola* em soja, em mistura com outros grupos de fungicidas (1). Os fungicidas ISDH são considerados de risco médio a alto de resistência (6). Apesar de ser o grupo de fungicidas sítio-específicos mais recente na cultura da soja, além de *C. cassiicola*, também foi relatada a menor sensibilidade do fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd. a fungicidas ISDH no Brasil (17). O aumento na frequência de isolados com menor sensibilidade pode ocorrer pelo excesso de aplicações de fungicidas sítio-específicos. Além da soja, *C. cassiicola* infecta o algodão (3), semeado em sucessão a cultura da soja na região do Cerrado.

Os valores de  $CE_{50}$  podem variar de acordo com o método e o meio de cultura utilizados. Mackenzie (11), ao avaliar a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* a fungicidas ISDH nos meios de cultura YBA e BDA, observou que isolados identificados como resistentes a boscalida em BDA ( $> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram valores de  $CE_{50}$  significativamente menores em YBA, variando de  $2,52 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $27,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O mesmo autor observou na análise de dez isolados forte correlação de Pearson entre os valores da  $CE_{50}$  obtidos a partir da utilização dos meios de cultura YBA e BDA para os fungicidas pentiopirade ( $r = 0,76$ ), benzovindiflupir ( $r = 0,856$ ) e fluopiram ( $r = 0,965$ ). Para o fungicida fluxapiraxade, foi observada correlação de Pearson mais fraca ( $r = 0,683$ ,  $p = 0,0295$ ), porém a correlação de Spearman correspondente foi alta ( $\rho = 0,927$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Apesar das diferenças nas estimativas de  $CE_{50}$ , o autor concluiu que a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* pode ser distinguida em qualquer meio de cultura.

Nesse trabalho foi utilizado o método de microtitulação colorimétrica. Xavier et al. (20) observaram correlação ao avaliar a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* aos fungicidas dos grupos dos IQe, IDM e MBC utilizando os métodos de crescimento micelial

e microtitulação colorimétrica. No entanto, os valores de  $CE_{50}$  obtidos pelo método de microtitulação foram em média 36 vezes menores para carbendazim e 288 vezes menores para o protriocanazol, quando comparados aos valores obtidos pelo método de crescimento micelial. No método de microtitulação, os esporos fúngicos são completamente imersos na suspensão contendo o fungicida, o que difere do método de inibição de crescimento micelial em placas, onde apenas uma parte da colônia do fungo está em contato com o meio de cultura sólido contendo o fungicida (20). Embora a magnitude dos valores possa ser diferente entre os métodos de monitoramento, a sensibilidade de isolados pode ser distinguida em ambos os métodos (11, 21), devendo ser padronizada no laboratório para permitir a comparação ao longo dos anos.

A utilização de fungicidas para controle da mancha-alvo é uma das estratégias mais utilizadas para evitar perdas de produtividade em cultivares suscetíveis. Entretanto relatos de casos de resistência do fungo *C. cassiicola* aos fungicidas sítio-específicos vêm aumentando. Nesse estudo foi observada variação na sensibilidade de *C. cassiicola* a fungicidas ISDH dentro do mesmo local de coleta. Dessa forma é importante que as recomendações de controle incluam estratégias antirresistência, como a utilização de fungicidas formulados em misturas de dois ou mais ingredientes ativos, associados a fungicidas multissítios, evitando a repetição da aplicação com o mesmo fungicida e limitando o número de aplicações de fungicidas ISDH na cultura com objetivo de reduzir a pressão seletiva e evitar o aumento de populações com menor sensibilidade aos fungicidas e falhas de controle. Uma vez que o fungo infecta diferentes culturas semeadas em sucessão, como o algodão e a crotalaria, é importante que o manejo de fungicidas seja feito dentro do sistema produtivo, para tentar reduzir o número de aplicações ao longo do ano agrícola.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrofit. **Agrofit**: consulta aberta. Brasília, DF: MAPA, c2023. Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 21 jun. 2024.
2. Avenot, H.F.; Michailides, T.J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi, **Crop Protection**, Guildford, v.29, n.7, p.643-651, 2010.
3. Dixon, L.J.; Schlub, R.L.; Pernezny, K.; Datnoff, L.E.; Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, St. Paul, v.99, n.9, p.1015-1027, 2009.
4. Edwards Molina, J.P.; Paul, P.A.; Amorim, L.; da Silva, L.H.C.P.; Siqueri, F.V.; Borges, E.P.; Campos, H.D.; Venancio, W.S.; Meyer, M.C.; Martins, M.C.; Balardin, R.S.; Carlin, V.J.; Grigolli, J.F.J.; Belufi, L.M. R.; Nunes Junior, J.; Godoy, C.V. Effect of target spot on soybean yield and factors affecting this relationship. **Plant Pathology**, Hoboken, v.68, n.1. p.107-115, 2019.
5. Edwards Molina, J.P.; Paul, P.A.; Amorim, L.; da Silva, L.H.C.P.; Siqueri, F.V.; Borges, E.P.; Campos, H.D.; Nunes Junior, J.; Meyer, M.C.; Martins, M.C.; Balardin, R.S.; Carlin, V.J.; Grigolli, J.F.J.; Belufi, L.M.R.; Godoy, C.V. Meta-analysis of fungicide efficacy on soybean target spot and cost-benefit assessment. **Plant Pathology**, Hoboken, v.68, n.1, p. 94-106, 2019.
6. FRAC. **Summary of annual Sensitivity Monitoring**. Brussels: FRAC, 2023. Disponível em: <https://www.frac.info/knowledge-database/summary-of-annual-monitoring>. Acesso em: 12 jun. 2023.

7. Godoy, C.V. Target spot. In: Hartman, G.L.; Rupe, J.C.; Sikora, E.F.; Domier, L.L.; Davis, J.A.; Steffey, K.L. **Compendium of soybean diseases and pests**. St Paul: APS Press, 2015. p.62-63.
8. Godoy, C.V.; Utiamada, C.M.; Meyer, M.C.; Campos, H. D.; Lopes, I. de O.N.; Tomen, A.; Mochko, A.C.R.; Dias, A.R.; de Farias, A.; Sichoeki, D.; Moreira, E.N.; Konageski, F.T.; dos Santos, J.; Ascari, J.P.; Kudlawiec, K.; Belufi, L.M. de R.; Lima, L.A. de S.; da Silva, L.H.C.P.; Araújo Júnior, I.P.; Goussain Júnior, M.M.; Stefanelo, M.S.; Müller, M.A.; Martins, M.C.; Tormen, N.R.; Konageski, T.F. **Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na cultura da soja, na safra 2022/2023**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos Londrina: Embrapa Soja, 2023. (Circular Técnica, 194).
9. Ishii, H.; Miyamoto, T.; Ushio, S.; Kakishima, M. Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. **Pest Management Science**, Hoboken, v.67, n.4, p. 474-482, 2011.
10. Klosowski, A.C.; May-De-Mio, L.L.; Miessner, S.; Rodrigues, R.; Stammler, G. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest Management Science**, Hoboken, v.72, n.6. p.1211-1215, 2016.
11. Mackenzie, K. J. **Target spot of tomato in Florida: a current review and statewide characterization of respiration inhibitor fungicide sensitivity**. 2017. 107f. Thesis (Master of Science) - University of Florida, Flórida.
12. Mello, F.E. de; Lopes-Caitar, V.S.; Xavier-Valencio, S.A.; Silva, H.P. da; Franzenburg, S.; Mehl, A.; Alexander-Verreet, J.; Balbi-Peña, M.I.; Marcelino-Guimarães, F.C.; Godoy, C.V. Resistance of *Corynespora cassiicola* from soybean to QoI and MBC fungicides in Brazil. **Plant Pathology**, Hoboken, v.71, n.2., p. 373-385, 2022.
13. Ritz, C.; Baty, F.; Streibig, J.C.; Gerhard, D. Dose-Response Analysis Using R **Plos One**, San Francisco, v.10, n.12, e0146021, 2015.
14. Schmitz, H.K.; Medeiros, A.C.; Craig, I.R.; Stammler, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-oxidoreductase inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, Hoboken, v.70, n.3., p.378-388, 2014.
15. Shi, Y.; Zhu, F.; Sun, B.; Xie, X.; Chai, A.; Li, B. Two adjacent mutations in the conserved domain of SdhB confer various resistance phenotypes to fluopyram in *Corynespora cassiicola*. **Pest Management Science**, Hoboken, v.77, n.9 p.3980-3989, 2021.
16. Sierotzki, H.; Scalliet, G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation Succinate Dehydrogenase Inhibitors fungicides. **Phytopathology**, St. Paul, v.103, n.9, p.880-887, 2013.
17. Simões, K.; Hawlik, A.; Rehfus, A.; Gava, F.; Stammler, G. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Londres, v.125, n.1., p.21-26, 2018.
18. Stammler, G.; Speakman, J. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v.154, n.7, p.508-510, 2006.
19. Stammler, G.; Benzinger, G.; Speakman, J. A rapid and reliable method for monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to boscalid. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v.155, p.746-748, 2007.
20. USDA Fungal Databases. Disponível em: <https://fungi.ars.usda.gov/> Acesso em: 21 jun. 2024.
21. Xavier, S.A.; de Mello, F.E.; da Silva, H.P.; Canteri, M.G.; Koga, L.J.; Lopes, I.de O.N.; Godoy, C.V. Microtiter method to monitor *Corynespora cassiicola* and sensitivity of the pathogen to carbendazim, prothioconazole and pyraclostrobin, **Crop Protection**, Guildford, v.144, p.105554, 2021.

Editor associado para este artigo: Paulo Cezar Ceresini