

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**MÉTODOS DE APLICAÇÃO E DE AVALIAÇÃO DO RESIDUAL DE
FUNGICIDAS NO CONTROLE DE MOFO-BRANCO EM SOJA E
FEIJÃO**

THOMAS JOSÉ JUSTO MIORINI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Proteção de
Plantas)

BOTUCATU – SP
Dezembro – 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**MÉTODOS DE APLICAÇÃO E DE AVALIAÇÃO DO RESIDUAL DE
FUNGICIDAS NO CONTROLE DE MOFO-BRANCO EM SOJA E
FEIJÃO**

THOMAS JOSÉ JUSTO MIORINI

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Raetano
Co-Orientador: Prof. Dr. João Carlos Cury Saad

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Proteção de
Plantas)

BOTUCATU – SP
Dezembro - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M669m Miorini, Thomas José Justo, 1987-
Métodos de aplicação e de avaliação do residual de fungicidas no controle de mofo-branco em soja e feijão / Thomas José Justo Miorini. - Botucatu : [s.n.], 2015
ix, 140 f. : fots. color.; grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2015

Orientador: Carlos Gilberto Raetano

Coorientador: João Carlos Cury Saad

Inclui bibliografia

1. Feijão comum - Doenças e pragas. 2. Soja - Doenças e pragas. 3. Fungicidas. 4. Pragas agrícolas - Controle. I. Raetano, Carlos Gilberto. II. Saad, João Carlos Cury. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "MÉTODOS DE APLICAÇÃO E DE AVALIAÇÃO DO RESIDUAL DE FUNGICIDAS
NO CONTROLE DE MOFO-BRANCO EM SOJA E FEIJÃO"**


AUTOR: THOMAS JOSÉ JUSTO MIORINI

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOÃO CARLOS CURY SAAD

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO
Dep. de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu


Prof. Dr. EDSON LÚIZ FURTADO
Dep. de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu


Prof. Dr. JOÃO PAULO ARANTES RODRIGUES DA CUNHA
Instituto de Ciências Agrárias / Universidade Federal de Uberlândia


Profa. Dra. SILVANIA HELENA FURLAN
Instituto Biológico


Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN
Depto. Entomologia Fitopatologia e Zoologia Agrícola - ESALQ - USP

Data da realização: 16 de dezembro de 2015.

“Eu acredito na sorte e tenho constatado que quanto mais duro trabalho, mais sorte tenho.”

Tomas Jefferson

Aos meus pais, Marcia e Nardo, e minhas irmãs, Bia e Fran.

Ofereço

Agradecimentos

A Deus Pai todo poderoso toda honra e toda glória. Obrigado Senhor Jesus pela oportunidade de mais uma conquista e por todas as bênçãos que tem colocado em minha vida.

À minha família.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Raetano pela oportunidade de ingressar no programa de Pós-Graduação em Agronomia – Proteção de Plantas, após ter concluído o Mestrado em Agronomia – Irrigação e Drenagem. Também agradeço pela amizade, orientação e ensinamentos durante esse período.

Ao Prof. Dr. João Carlos Cury Saad pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, além de ter me orientado durante a condução do Curso de Mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Sydney E. Everhart por toda ajuda prestada durante meu tempo nos EUA em 2014-2015 e por colaborar na parte escrita dos capítulos em inglês.

Ao Prof. Dr. James Steadman, pelas orientações e pela oportunidade de adquirir conhecimentos no laboratório de Fitopatologia da Universidade de Nebraska – Lincoln durante 4 meses (2012) e 7 meses (2014-2015).

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, por autorizar a utilização do laboratório de Fitopatologia do Departamento de Proteção Vegetal e condução dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos de Doutorado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Proteção de Plantas, pela oportunidade concedida.

Aos Professores que participaram de minha Qualificação (Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni e Prof^a. Dr^a. Adriana Zanin Kronka) e defesa de Tese (Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, Prof. Dr. João Paulo Antunes Rodrigues da Cunha, Prof. Dr. José Otávio Menten, Pesquisadora Dr^a. Sylvania Helena Furlan), pelas críticas e sugestões.

Aos funcionários do laboratório de Fitopatologia da Universidade de Nebraska (Rachana, Rebeca Becky e Graziela), pela paciência e ensinamentos.

À Pós-Doutoranda e amiga Adriene Woods Pedrosa pela ajuda na correção e edição de resumos expandidos e da tese.

À Pós-Doutoranda Ana Carolina Firmino, pelas explicações e colaboração nos trabalhos realizados no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP/Botucatu.

À Fazenda Cercadinho, localizada no município de Itaí, pela liberação da área para condução do experimento sob pivô central, em 2013.

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Agrícola (CPDA) – Arysta LifeScience, em especial para Ângelo Stasievski e Dorival Boer Júnior, pela amizade e auxílio nas conduções dos trabalhos. Não posso deixar de citar outros nomes que direta ou indiretamente colaboraram para a realização dos trabalhos no CPDA: João Miyassaki, Gustavo Yépez, Giuvan Lenz, Alcindo, Marcelo Bonfim, Pedro Cardoso, João Leite, Josias, Mauro, Batista, Juliano, Roberto, João Campos, Francisco e Lucia.

Aos amigos que colaboraram na condução dos experimentos no CPDA – Arysta LifeScience, Luiz Henrique Almeida, Rafael Werle e Jhonatan Cavaliere.

À Lucky Mehra, indicado pela Dr^a Sydney, que auxiliou na resolução de algumas análises estatísticas do projeto.

À seção de Pós-Graduação e funcionários.

A todos os amigos, colegas e funcionários do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP/Botucatu.

Aos amigos Marcela Leite Campos Menegale, Marísia da Silva, Luiz Henrique Almeida, Rafael Werle, Rodrigo Werle, Lia Marchi da Silva, Bernardo Tomchinsky, Rafael Augusto Ferraz, Thiago, Pablo, sempre presentes e que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos moradores das repúblicas de Botucatu (Monte Olimpo, Mata-Burro).

Aos amigos que conviveram comigo nos EUA, Lia, Rodrigo, Leilinha, Leonardo, Laura, Camila, Felipe, Maxwell, Suzana, Chikoti, Lauren, Denny, Roy, José Paulo e Tony.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
SUMMARY	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Cultura do feijoeiro	8
2.2 Cultura da soja	9
2.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	10
2.4 Sintomas	11
2.5 Ciclo da doença	12
2.6 Epidemiologia	15
2.7 Manejo para controle do mofo-branco	16
2.7.1 Rotação de culturas	17
2.7.2 Tratamento de sementes	18
2.7.3 Práticas culturais	18
2.7.4 Uso de cultivares tolerantes	19
2.7.5 Adoção do sistema de plantio direto na palha	19
2.7.6 Controle biológico	20
2.7.7 Controle químico	21
2.7.7.1 Modo e mecanismo de ação dos fungicidas	23
2.7.7.2 Propriedades físico-químicas dos fungicidas	24
2.7.7.3 Fungigação	24
2.7.8 Medidas alternativas de controle	27
2.8 Métodos para avaliação do residual de fungicidas	27
2.8.1 Método da Cromatografia	28
2.8.2 Incidência e severidade do mofo-branco	28
2.8.3 <i>Straw test</i>	29
2.8.4 <i>Detached leaf assay</i>	29
Capítulo I - “ MÉTODOS INDIRETOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RESIDUAL DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DO MOFO-BRANCO EM FEIJOEIRO”	30

RESUMO	30
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	49
AGRADECIMENTOS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
TABELAS	54
FIGURAS	57
Capítulo II - “APPLICATION METHODS AND FUNGICIDES RESIDUES EVALUATION APPLIED FOR WHITE MOLD CONTROL IN SOYBEAN”	60
ABSTRACT	60
INTRODUCTION	61
MATERIAL AND METHODS	64
RESULTS	70
DISCUSSION	75
ACKNOWLEDGEMENTS	78
LITERATURE CITED	78
TABLES	85
FIGURES	88
Capítulo III “RESIDUAL ACTIVITY OF FUNGICIDES APPLIED BY CHEMIGATION FOR WHITE MOLD CONTROL IN DRY BEAN”	92
ABSTRACT	92
INTRODUCTION	93
MATERIAL AND METHODS	97
RESULTS	102
DISCUSSION	106
ACKNOWLEDGEMENTS	109
LITERATURE CITED	110
TABLES	116

FIGURES	120
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
4 CONCLUSÕES	127
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

RESUMO

O feijoeiro e a soja são culturas importantes como fontes protéicas para o Brasil, e suas produtividades são seriamente afetadas pelo mofo-branco (causado por *Sclerotinia sclerotiorum*). Para o seu controle, é recomendado o manejo integrado da doença, no entanto, prevalece o controle químico. O controle químico desse fungo pode ser realizado por pulverização convencional com trator-pulverizador ou por fungigação. O trabalho objetivou avaliar indiretamente a atividade residual dos fungicidas fluazinam, procimidona e tiofanato metílico sobre o controle do mofo-branco pelo *Detached leaf assay* (DLA), aplicados por pulverização e por quimigação na soja e no feijão, avaliar o desenvolvimento de escleródios e a produtividade do feijoeiro submetido a aplicações por fungigação. Dois pré-testes foram conduzidos em casa de vegetação com os fungicidas aplicados em pulverização convencional no feijoeiro. Constatou-se que o DLA pode ser utilizado para avaliar indiretamente a atividade residual de fungicidas. Na cultura da soja, três experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito da quimigação, da pulverização de fungicidas associados a óleo mineral e do método de Quenchers para avaliar a concentração de fungicidas no controle do mofo-branco. Pelo DLA, verificou-se que os fungicidas têm períodos residuais distintos entre eles e que lâminas d'água maiores diminuem mais rapidamente o residual do ingrediente ativo. O uso do óleo mineral não influenciou no período residual dos fungicidas após a primeira pulverização. Pelo método

de Quencher, as taxas de decréscimo na concentração dos fungicidas foram calculadas para três ingredientes ativos com a constatação de que o fluazinam diminui mais rapidamente a concentração, seguido dos fungicidas procimidona e do carbendazim. Mais três experimentos foram conduzidos no feijoeiro a campo para estudo do residual de fungicidas com aplicação em pivô central e aplicações com aspersores em 2013 e 2014, com avaliação do desenvolvimento de escleródios e produtividade nestes dois últimos. No experimento sob pivô, observou-se diferenças na Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) entre as diferentes lâminas d'água. Lâminas d'água maiores diminuíram mais rapidamente o período residual dos produtos fitossanitários. Tratamentos com procimidona apresentaram maior produtividade em 2013, porém em 2014, maior produtividade foi obtida com fluazinam independente da lâmina d'água e do modo de pulverização. Em 2014, constatou-se que o período residual dos fungicidas na fungigação foi menor do que na pulverização convencional.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phaseolus vulgaris* L., *Glycine max* L. Merrill, quimigação, Método da folha destacada

APPLICATION METHODS AND FUNGICIDES RESIDUES EVALUATION APPLIED FOR WHITE MOLD CONTROL IN SOYBEAN AND DRY BEAN. Botucatu, 2015. 140p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Thomas José Justo Miorini

Adviser: Carlos Gilberto Raetano

Co-adviser: João Carlos Cury Saad

SUMMARY

Dry bean and soybean are very important crops as protein source in Brazil, and their yields are seriously affected by white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). To control this pathogen, integrated disease management is recommended, however, chemical control is commonly used. Fungicides can be applied by sprayer application with tractor or chemigation. The present study aimed to evaluate indirectly the residual activity of fluazinam, procymidone and thiophanate methyl on white mold control by Detached Leaf Assay (DLA), applied by conventional application (sprayer) and chemigation in soybeans and dry beans, and investigate sclerotia formation of *S. sclerotiorum* and yields in dry bean by chemigation application. Two pre-tests were performed under greenhouse conditions, where fungicides were applied in conventional manner (sprayer). DLA can be used to assess, indirectly, the residual activity of fungicides applied for white mold control. In soybean, three field experiments were conducted to evaluate the effect of chemigation, effectiveness of fungicides applied with adjuvant, and Quenchers method for assessing the concentration of three fungicides for white mold control. It was observed with DLA that fungicides have different effects on the residual period, where higher water levels decreased more quickly the residual activity of the active ingredient. The use of adjuvant did not influence the residual period after the first application. For Quencher method, the rates of decrease in the concentration of fungicides were calculated showing that the concentration decreases more quickly in fluazinam fungicide, followed by procymidone and carbendazim. Three experiments were conducted in dry bean to study the residual activity of fungicides with an application by center pivot and two applications with sprinkler irrigation in 2013 and 2014, evaluating the *S. sclerotiorum* sclerotia and yield in sprinkler experiments. In the experiment via pivot, differences were observed in area under disease progress curve (AUDPC) between different water levels. Higher water levels more rapidly decreased

residual fungicide activity. Treatments applied with procymidone showed higher productivity in 2013, however, 2014 resulted in the highest productivity when treated with fluazinam, regardless water levels and application method. In 2014, the residual activity of fungicide decreased more quickly in applications via chemigation when compared with sprayer application.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phaseolus vulgaris* L., *Glycine max* L. Merrill, chemigation, Detached leaf assay

1 INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum, causador do mofo-branco, é um fungo que afeta mais de 400 espécies de plantas. Entre essas espécies, o feijoeiro e a soja são hospedeiras deste patógeno quando as condições ambientais são propícias para o desenvolvimento do fungo.

O manejo integrado é recomendado para o controle da doença, como a adoção de maiores espaçamentos; manejo adequado da irrigação (pois alta umidade favorece o desenvolvimento do patógeno); controle de plantas não hospedeiras do patógeno; controle biológico; entre outras. Apesar de estarem disponíveis várias alternativas de controle, o uso de produtos fitossanitários tem prevalecido, em especial quando a cultura já está implantada e o fungo começa a se desenvolver no campo.

A aplicação do produto fitossanitário pode ser realizada por pulverização convencional, mas a fungigação mostra-se como um método viável para o controle do mofo-branco, por conciliar a aplicação do fungicida com a irrigação da cultura. A fungigação faz com que o produto atinja o solo, o que pode afetar as diferentes estruturas do ciclo de vida do patógeno, como apotécios, escleródios, ascósporos e micélios. Além disso, os produtos sistêmicos podem ser mais vantajosos por serem absorvidos também pelas raízes das plantas prolongando assim seu efeito sobre o patógeno.

A primeira aplicação do fungicida deve ser realizada quando as plantas de feijão e soja estão em pleno florescimento, pois as flores funcionam como uma fonte de energia para o desenvolvimento inicial do fungo, germinação e penetração na planta. É nesse estágio que as plantas necessitam de um suprimento elevado de água. Por isso, pode haver o benefício do uso conciliado da irrigação com a aplicação de fungicidas.

Nas bulas de fungicidas usados no controle do mofo-branco recomenda-se que a primeira aplicação seja realizada no florescimento e outras aplicações, quando necessárias, com aproximadamente 10 dias de intervalo e no máximo 3 aplicações durante o ciclo da cultura. Porém, não há relatos de trabalhos comprovando o período residual do fungicida.

Em relação à quimigação, prevalece a dúvida sobre qual é o tempo de atividade residual do fungicida quando aplicado em diferentes lâminas d'água e se esse período seria diferente quando comparado à pulverização convencional. A maior diluição do fungicida, com conseqüente menor concentração do ingrediente ativo, pode afetar a eficácia do produto, reduzindo o tempo de atividade residual do produto fitossanitário e, com isso, o controle das doenças. Produtores e consultores usam e recomendam a aplicação por fungigação utilizando a maior velocidade do pivô central, ou seja, aplicando o fungicida com a água de irrigação na menor lâmina d'água possível visando o controle do mofo-branco.

Os métodos utilizados para avaliar a atividade residual dos produtos fitossanitários são muito dispendiosos e exigem significativos investimentos laboratoriais. Por isso, é essencial encontrar um método simples para determinação rápida da atividade residual de produtos fitossanitários e o Método da folha destacada (*Detached leaf assay* - DLA) pode ser utilizado para acompanhar indiretamente essa atividade dos fungicidas utilizados no controle do mofo-branco. O método baseia-se na coleta de folhas após a pulverização no campo e a inoculação do fungo *S. sclerotiorum* nessas folhas.

Em geral, a infecção primária de *S. sclerotiorum* ocorre após germinação dos ascósporos e a infecção secundária ocorre pelo contato direto do micélio do fungo com outras plantas adjacentes ou mesmo na própria planta, em folhas, hastes ou pecíolos. Este projeto foi desenvolvido para avaliar o controle do fungo na infecção

secundária, ou seja, no contato do micélio do fungo nas folhas coletadas de campos tratadas com fungicidas.

A presente pesquisa foi realizada a partir das seguintes hipóteses: I) o DLA pode ser utilizado para avaliar indiretamente a atividade residual de fungicidas; II) O uso de fungicidas associados a óleo mineral pode aumentar a atividade residual dos fungicidas; III) lâminas d'água maiores diminuem mais rapidamente o residual dos produtos fitossanitários; IV) há diferenças na atividade residual dos fungicidas sobre o controle do patógeno e a produtividade das culturas. Portanto, os objetivos do trabalho foram avaliar indiretamente a atividade residual de fungicidas usados no controle do mofo-branco nas culturas da soja e do feijoeiro, bem como avaliar o desenvolvimento de esclerpodios e a produtividade no feijoeiro submetido à diferentes técnicas de aplicação.

Para atingir estes objetivos a tese será dividida em 3 capítulos, sendo o primeiro capítulo intitulado “MÉTODOS INDIRETOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RESIDUAL DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DO MOFO-BRANCO EM FEIJOEIRO”, redigido em português conforme as normas da revista *Summa Phytopathologica*; o segundo capítulo intitulado “APPLICATION METHODS AND FUNGICIDES RESIDUES EVALUATION APPLIED FOR WHITE MOLD CONTROL IN SOYBEAN”, redigido em inglês conforme as normas da revista *Tropical Plant Pathology*; o terceiro capítulo intitulado “RESIDUAL ACTIVITY OF FUNGICIDES APPLIED BY CHEMIGATION FOR WHITE MOLD CONTROL IN DRY BEAN”, redigido em inglês conforme as normas da revista *Plant Disease*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do feijoeiro

O cultivo do feijoeiro no Brasil é realizado em três épocas distintas: 1ª safra – safra das “águas” – semeadura de setembro a novembro; 2ª safra – safra da “seca” – semeadura de janeiro a março; e 3ª safra – safra de inverno – semeadura de abril a junho.

Nas três épocas, a área total de feijão cultivada no Brasil foi de 3,37 milhões de hectares na safra 2013/2014 e a estimativa é que a safra 2014/2015 seja menor em 7% que a safra anterior, com um total de 3,13 milhões de hectares. A produção nacional de feijão na safra 2013/2014 foi de 3,45 milhões de toneladas e deverá ficar em 3,41 milhões de toneladas na safra 2014/2015, o que corresponde a uma redução de 1,1% em relação à última safra (CONAB, 2015).

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), com produção de 3,5 milhões de toneladas. O feijoeiro é cultivado em todo território nacional por pequenos e grandes produtores (MAPA, 2015). Este é um produto agrícola de elevada expressão econômica e social. Considerado o alimento básico para a alimentação de pessoas mais necessitadas, exerce importante função social no suprimento

das necessidades nutricionais dessa parte da população, além de desempenhar papel fundamental na composição da produção agrícola brasileira (CORDEIRO et al., 1998).

O cultivo de feijão pode ser realizado sob o regime sequeiro, onde a irregularidade das chuvas e altas temperaturas têm contribuído consideravelmente para a deficiência hídrica e consequente redução da produtividade. A instabilidade climática afeta o feijoeiro em quase todas as regiões produtoras do Brasil, com períodos de excessos e de deficiência hídrica. O emprego da irrigação para o feijoeiro é essencial em regiões onde ocorre distribuição irregular das precipitações pluviais, provocando grande oscilação na produção nacional de feijão (OLIVEIRA, 2011).

O feijoeiro é uma planta sensível à deficiência hídrica e ao excesso de água no solo (SILVEIRA; STONE, 2004). O requerimento de água varia com o estágio de desenvolvimento da cultura, de um valor mínimo na germinação até o máximo na floração e formação das vagens, e na maturação esse consumo diminui (NÓBREGA et al., 2001). A ausência de irrigação durante a fase vegetativa ou durante a fase de florescimento reduz a produtividade em 80% no feijoeiro (MIORINI et al., 2011). A redução na produtividade sob estresse hídrico deve-se à baixa porcentagem de vingamento das flores, causando abortamento de óvulos e produzindo assim vagens chochas (AIDAR et al., 2002).

A ocorrência de doenças é outro fator limitante à obtenção de maiores rendimentos no feijoeiro, pois esta é acometida por diversas doenças, causadas por fungos, bactérias e vírus. Entre as doenças destaca-se o mofo-branco (*S. sclerotiorum*), cuja ocorrência vem aumentando significativamente, tanto em relação à incidência quanto em extensão nas áreas cultivadas.

O feijoeiro pode sofrer em média danos de 30% ou mais, principalmente em períodos chuvosos e quando não são tomadas medidas preventivas (OLIVEIRA, 2005).

2.2 Cultura da Soja

A oleaginosa é uma das principais culturas de verão da produção agrícola brasileira, que possui a segunda maior área mundial, atrás somente dos Estados Unidos da América (EUA). A área cultivada foi de 30,17 milhões de hectares semeados na safra 2013/2014 e 31,57 milhões de hectares semeados na safra de 2014/2015. A

expectativa de produção na safra 2014/2015 é de mais de 95 milhões de toneladas, o que representa um incremento de 10,4% em relação ao produzido na safra passada (CONAB, 2015).

As doenças da soja representam um importante fator de restrição da produção da cultura, sendo o mofo-branco, causado pelo fungo *S. sclerotiorum*, e a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, doenças que apresentam alto potencial de causar prejuízo à soja (MEYER; CAMPOS, 2009).

A incidência de mofo-branco na cultura da soja aumentou consideravelmente a partir de 2008, com estimativa de que cerca de 22,5%, ou seja, 6,8 milhões de hectares da área de cultivo de soja no Brasil estavam infestados pelo patógeno na safra 2013/2014 (MEYER et al., 2014; MEYER et al., 2015).

2.3 *Sclerotinia sclerotiorum*

S. sclerotiorum é considerado um patógeno de importância mundial por ocorrer em diferentes regiões geográficas, e também por ser um fungo de natureza polífaga, abrangendo 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras (BOLTON et al., 2006).

O mofo-branco é causado pelo fungo *S. sclerotiorum* (Lib) de Bary [syn *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.) Korf; Dumont] pertence à Classe dos Ascomycetos, Subclasse Discomycetos, Ordem Helotiales, Família Sclerotiniaceae e gênero *Sclerotinia* (BOLTON et al., 2006). A doença limita a produtividade (DEL RÍO et al., 2004; SINGH; SCHWARTZ, 2010) e reduz a qualidade das sementes e das vagens de diversas plantas.

O fungo não apresenta a fase assexuada mas pode ocorrer a formação de microconídios a partir de hifas ou apotécios (KOHN, 1979), no entanto, não ocorre germinação, sendo o seu papel na biologia do patógeno desconhecido (BOLTON et al., 2006).

A doença é bastante difundida no mundo, ocorrendo na maioria das áreas produtoras de feijão, como em regiões da América do Norte e da América do Sul e Europa (SCHWARTZ; STEADMAN, 1989). Epidemias também ocorrem na Austrália (JONES et al., 2011) e em alguns países do continente africano e asiático (ALLEN, 1983).

No Brasil, a *S. sclerotiorum* foi relatada pela primeira vez em 1921, no estado de São Paulo, na cultura da batata (CHAVES, 1961).

As condições ideais para o mofo-branco se manifestar em maiores intensidades são em anos chuvosos, temperatura amena e alta umidade relativa do ar (CAMPOS et al., 2010; TECNOLOGIAS, 2013). Devido à presença das estruturas de resistência chamadas escleródios, o fungo *S. sclerotiorum* é de difícil erradicação, logo, o mais importante é evitar a introdução do inóculo na área (ALEXOPOULOS et al., 1996; MASSOLA; KRUGNER, 2011).

A ocorrência generalizada do mofo-branco tem sido atribuída a mudanças nas práticas de manejo, germoplasma suscetível e condições ambientais favoráveis. O uso de espaçamentos mais estreitos, maior fertilidade, excesso de irrigação ou chuva principalmente durante o florescimento contribuem para uma densa população de plantas que favorecem uma alta umidade e temperaturas amenas no dossel, condições estas ideais para a infecção do fungo e o desenvolvimento da doença. Sequências de cultivo de soja/feijão ou outras culturas suscetíveis, resultam no acúmulo de inóculo no solo. O inóculo de *S. sclerotiorum* em sementes contribui para a propagação da doença (HARTMAN et al., 1998; HOFFMAN et al., 1998; MUELLER et al., 1999; BLAD et al., 1978; SCHWARTZ; STEADMAN, 1978).

2.4 Sintomas

O mofo-branco geralmente se inicia em reboleiras na lavoura, principalmente nos locais de alta densidade de plantas e em semeaduras de cultivares de hábito de crescimento indeterminado (prostrados). Os primeiros sintomas de *S. sclerotiorum* são manchas encharcadas generalizadas nas folhas baixas, que evoluem para a coloração castanho-claro e logo desenvolvem abundante formação de micélio branco e denso (Figura 1). Em poucos dias, o micélio transforma-se em massa negra e rígida, que é a estrutura de resistência (escleródio), formado tanto na superfície como no interior das hastes e vagens infectadas (FERREIRA et al., 1979, GRAU, 1988; GRAU, 1989; GRAU; HARTMAN, 1999; JULIATTI et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005). Ainda de acordo com estes autores, o fungo pode interferir na germinação de sementes, no estabelecimento e desenvolvimento de plântulas e atacar toda parte aérea, em qualquer

estádio de desenvolvimento. Os sintomas geralmente ocorrem no terço médio das plantas atingindo a haste principal, pecíolos, folhas e vagens.



Figura 1. Sintomas do mofo-branco, nas vagens (A) e folhas (B) do feijoeiro . Créditos da foto: Miorini (2013).

Os prejuízos diretos são decorrentes da menor produtividade das plantas. Entre as perdas indiretas, estão a condenação de áreas para a produção de sementes, o aumento do custo de produção e os custos ambientais decorrentes do controle químico.

2.5 Ciclo da doença

O escleródio é um agregado de hifas composto por uma camada externa grossa que contém melanina, esta substância é responsável por conferir resistência aos escleródios às condições adversas do solo e a degradação de alguns fungos (BELL; WHEELER, 1986; HENSON et al., 1999).

De acordo com Bolton et al. (2006), três etapas são necessárias para o desenvolvimento do escleródio: I) iniciação (as hifas agregam-se formando uma massa branca); II) desenvolvimento (crescimento das hifas para aumentar o tamanho) e III) maturação (delimitação da superfície, deposição de melanina nas células periféricas e consolidação interna).

Em condições ideais para o desenvolvimento do fungo, os escleródios (Figura 2A) podem germinar de maneira carpogênica ou miceliogênica, desencadeando um novo ciclo da doença (BOLTON et al., 2006).

A germinação miceliogênica é caracterizada pelo crescimento de hifas hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas. O girassol é o único hospedeiro conhecido que pode ser infectado pela invasão micelial direta em raízes, resultado de germinação miceliogênica de escleródios enterrados no solo (MIKLAS et al., 2013).

O micélio pode penetrar pela cutícula da planta hospedeira usando enzimas digestivas ou penetrando através dos estômatos com formação do apressório (LUMSDEN; DOW, 1973; LUMSDEN, 1979). Guimarães e Stotz (2004) demonstraram que o ácido oxálico produzido pelo fungo *S. sclerotiorum* durante a infecção está envolvido na desregulação da função da célula-guarda causando a abertura dos estômatos e consequentemente, invasão pelo micélio.

Para outros hospedeiros, as reservas contidas no escleródio não fornecem energia necessária para a formação do apressório e subsequente penetração no hospedeiro.

Os escleródios podem germinar no ano seguinte, produzindo um ou vários apotécios (BEDI, 1963; DEL RÍO et al., 2002) ou permanecem dormente por vários anos (COLEY-SMITH; COOKE, 1971; DEL RÍO et al., 2002). Os apotécios são produzidos de escleródios localizados até 5 cm da superfície do solo, e frequentemente depois do fechamento do dossel, quando temperaturas moderadas e alta umidade relativa estão presentes por várias horas (BOLAND; HALL, 1988; SCHWARTZ; STEADMAN, 1978; DEL RÍO et al., 2002). Os apotécios geralmente formam-se dentro de 4 a 12 semanas, embora alguns isolados raramente chegam a produzi-los (PRATT; ROWE, 1991). Os ascósporos são produzidos por estes apotécios, constituindo o inóculo primário da infecção, que ocorre na senescência floral (GRAU, 1988; DEL RÍO et al., 2002).

O apotécio é um corpo de frutificação aberto (Figura 2B), onde uma camada de ascos (himênio) fica exposta, ocorrendo a liberação de ascósporos de maneira forçada e simultânea, sendo considerados também como inóculo primário da doença (ALEXOPOULOS et al., 1996; MASSOLA; KRUGNER, 2011).

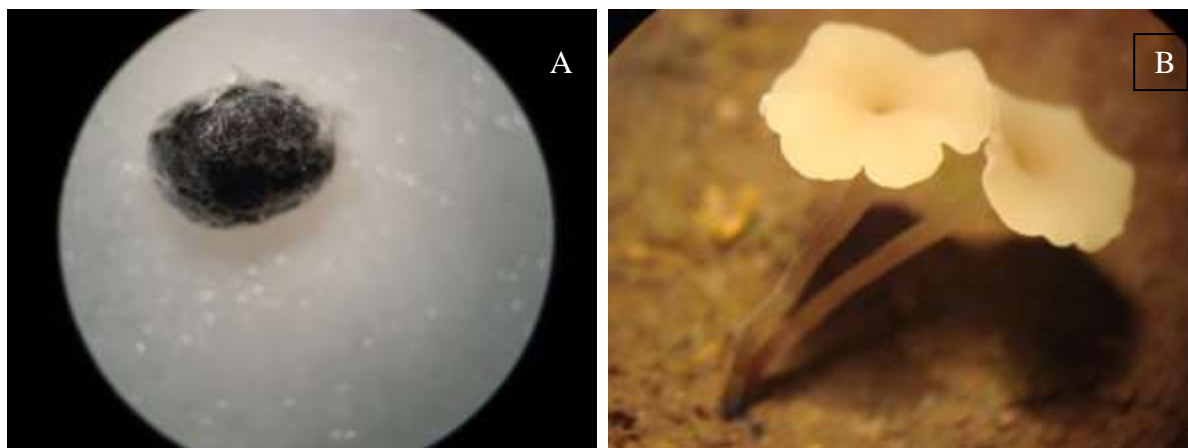


Figura 2. (A) Estrutura de resistência (escleródio); (B) Apotécio. Créditos da foto: Miorini (2009).

Nos apotécios são formados milhares de corpos de forma cilíndrica, os ascos, com oito ascósporos cada um (Figura 3). Cada apotécio pode produzir de 2 a 30 milhões de ascósporos durante um período de até 10 dias (CLARKSON et al., 2003). Muitos esporos são depositados dentro do campo onde são produzidos (WEGULO et al., 2000) embora alguns podem ser carregados pelo ar por vários quilômetros (LI et al., 1994).

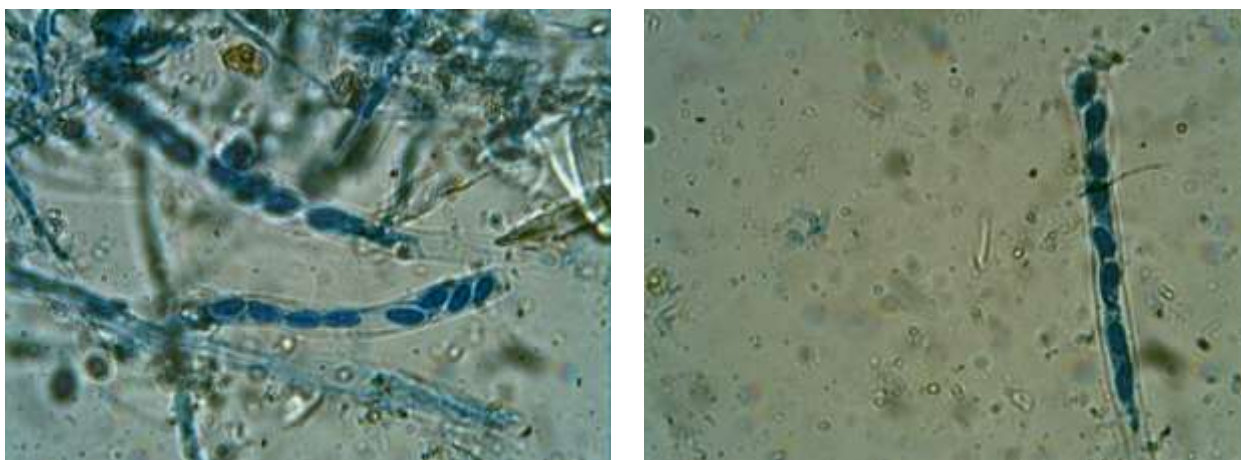


Figura 3. Ascus, contendo oito ascósporos cada. Créditos da Foto: Miorini (2013)

A liberação de ascósporos ocorre tanto de dia quanto à noite e a duração do período de liberação pode variar de 36 a 168 horas, declinando quando a umidade relativa do ar diminui e atinge de 65% a 75% (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; CLARKSON et al., 2003).

Os ascósporos de *S. sclerotiorum* são cobertos com mucilagem pegajosa que, além de formar agregados de esporos, auxilia sua adesão ao substrato (CLARKSON et al., 2003).

Os ascósporos podem germinar na superfície do hospedeiro mas não podem infectar a planta sem fonte de energia exógena (flores ou tecidos senescentes ou injuriados) e um filme de água (BOLTON et al., 2006; MIKLAS et al., 2013). Caso os esporos sejam lançados antes do florescimento ou não tiver tecido senescente ou injuriado disponível, os ascósporos podem sobreviver na superfície da planta ou na superfície do solo por aproximadamente duas semanas, entretanto, alta umidade relativa e luz ultravioleta são prejudiciais para a sobrevivência do esporo (CLARKSON et al., 2003; BOLTON et al., 2006).

Durante a interação com seu hospedeiro, o fungo *S. sclerotiorum* produz enzimas digestivas (pectinases, β -1-3-glucanases, celulases, xilanases, cutinases, glicosidases) que podem facilitar a penetração, maceração dos tecidos e degradação dos componentes da parede celular (HANCOCK, 1966; LUMSDEN, 1969; RIOU et al., 1991).

O micélio pode permanecer viável em flores colonizadas por até seis dias, na ausência de condições climáticas favoráveis, retomando o desenvolvimento quando as condições favoráveis retornarem (HARIKRISHNAN; DEL RÍO, 2006).

Assim que o micélio do fungo começa a desenvolver, ocorrem os primeiros sintomas, com desenvolvimento abundante de micélio branco e denso. Em poucos dias, o micélio transforma-se em massa negra e rígida, que é a estrutura de resistência (escleródio), formado tanto na superfície como no interior das hastes e vagens das plantas, servindo de inóculo para safras subsequentes.

2.6 Epidemiologia

A estrutura de resistência do patógeno pode permanecer no solo por anos esperando condições ideais para germinar (SCHWARTZ; STEADMAN, 1989). Este inóculo persistente no solo associado a grande número de hospedeiros contribuem para um alto potencial epidêmico da doença em muitos campos de produção onde culturas suscetíveis são cultivadas. A infecção primária ocorre pela liberação de ascósporos pelo

apotécio. De acordo com Tu (1987) há outros modos de infecção primária como: ascósporos infectando folhas em contato com o solo, folhas em contato com escleródios expostos na superfície do solo e infecções associadas com injúrias. Infecções secundárias ocorrem pelo contato dos tecidos verdes (vagens, folhas, ramos) com a área infectada e pode ocorrer dentro de 2-3 dias.

Para que o apotécio se desenvolva, escleródios dependem de umidade do solo por 1 ou 2 semanas e temperaturas ao redor de 11 a 20 °C (SCHWARTZ; STEADMAN, 1989). A condição ótima para formação de apotécios ocorre quando a umidade do solo for superior a 50% da capacidade de campo e quando a temperatura estiver entre 15 °C e 17,8 °C, em um período de 10-14 dias (CLARKSON et al., 2003). Porém, a germinação de escleródios pode ocorrer numa ampla faixa de temperatura, entre 10 °C e 25 °C (ABAWI; GROGAN, 1975; HAO et al., 2003). Devido à grande variação em temperaturas ótimas requeridas ter sido relatada, supõe-se que exista adaptação do patógeno a diferentes regiões geográficas (BARDIN; HUANG, 2001; PHILLIPS, 1987).

O micélio de tecidos infectados crescem mais rapidamente sob condições de umidade e moderada temperatura de 20 à 25 °C. Estas condições ótimas para a germinação do fungo e infecção da planta, coincidem com o fechamento do dossel das plantas do feijão e soja que ocorre durante o florescimento, aproximadamente 50 dias após a semeadura. Logo, tanto o microclima formado pelo dossel da cultura quanto as condições climáticas em geral, possuem um impacto sobre epidemias de mofo-branco (MIKLAS et al., 2013).

O fungo *S. sclerotiorum* pode ser disseminado de diversas maneiras, dentre as quais pelas sementes, pelos implementos e maquinários agrícolas infestados, solos infestados, plantas invasoras e tigueras (plantas remanescentes do plantio anterior) suscetíveis ao patógeno, restos culturais e vento (JULIATTI et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; SAHARAN; MEHTA, 2008).

2.7 Manejo do mofo-branco

Recomenda-se o manejo integrado, pois medidas isoladas de controle não proporcionam resultado satisfatório (GRAU, 1988; GRAU, 1989, YORINORI

et al., 1993; GRAU; HARTMAN, 1999; ALMEIDA et al., 2005; JULIATTI; JULIATTI, 2010). Algumas medidas no manejo integrado incluem o uso de sementes certificadas; rotação de culturas com gramíneas; escolha da época de semeadura das culturas; preferência a cultivares de porte ereto; evitar plantios adensados; adubação nitrogenada equilibrada; plantio direto na palha; controle de plantas daninhas suscetíveis e de plantas voluntárias; limpar e lavar máquinas e implementos agrícolas; utilização de controle químico, preferencialmente de forma preventiva (GRAU, 1988; GRAU, 1989; YORINORI et al., 1993; CARREGAL et al., 2005; JULIATTI; JULIATTI, 2010; MEYER et al., 2011; CAMPOS et al., 2011); tratamento de sementes (GOULART, 2005); controle biológico (ZENG; HAO, 2009; HIGHLAND; WALGENBACH, 2009; REZENDE et al., 2010) e controle alternativo, como extratos vegetais (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; GRABICOSKI; JACCOUD-FILHO, 2009; GRABICOSKI et al., 2011). Cada uma dessas medidas podem reduzir os danos causados pelo mofo-branco e minimizar as perdas de produtividade.

Um manejo econômico e racional da doença deve permitir a aplicação das técnicas em um momento adequado, a fim de se atingir a cultura em sua totalidade, como também a superfície do solo, onde ficam as estruturas de resistência (escleródios) e de reprodução (apotécios).

2.7.1 Rotação de culturas

Apesar da rotação de cultura não prevenir a infecção do fungo, essa prática proporciona a não produção de mais escleródios nessa área, diminuindo a fonte de inóculo no próximo plantio de alguma cultura suscetível. O plantio consecutivo de plantas suscetíveis à *S. sclerotiorum* como feijão, soja, ervilha, tomate, amendoim, batata, girassol entre outras, podem aumentar o potencial de danos no campo, por constituir uma fonte de inóculo na área.

A rotação de culturas pode ser realizada com gramíneas como milho, milheto, sorgo e braquiária. De acordo com Almeida et al. (2005), apesar do fungo infectar mais de 400 espécies de plantas, as gramíneas não estão incluídas nesse grupo.

2.7.2 Tratamento de sementes

O tratamento de sementes com fungicidas é, também, uma alternativa no manejo da doença. Esta é uma tecnologia de baixo custo, baixo risco ambiental e, em geral, apresenta efeito significativo na produtividade (MENTEN et al., 2005).

As sementes devem ser tratadas com fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de preferência com mistura de produtos de ação sistêmica e protetora. Geralmente, o tratamento das sementes tem eficiência alta em erradicar o patógeno dormente no interior delas.

As sementes podem ser tratadas com mistura fungicida de fludioxonil, metalaxil-M e tiabendazol e a mistura de fluazinam e tiofanato metílico (SEAB, 2015).

2.7.3 Práticas culturais

Uso eficiente da água de irrigação é importante, pois o desenvolvimento da doença depende da umidade superficial do solo. A infecção do mofo-branco pode ser reduzida mantendo a superfície do solo o mais seco possível durante o estágio de enchimento de grãos e maturação. Portanto, a irrigação deve ser utilizada somente para atender o quanto a cultura necessita para seu crescimento (SCHWARTZ et al., 2011). Porém, o manejo da irrigação é complicado, pois os estádios em que a planta de feijão mais necessita de água são na fase vegetativa e florescimento (MIORINI et al., 2011), e entre estes dois o mais propício ao desenvolvimento do fungo é o estágio de florescimento. A presença das flores e o dossel fechado da planta garantem as condições adequadas, por respectivamente serem fonte de energia e propiciar adequada umidade e temperatura.

Alta densidade de plantas na cultura, largura entre linhas estreita e excesso de fertilização nitrogenada são associados ao aumento da incidência de mofo-branco em muitas culturas (GRAU; RADKE, 1984; NATTI, 1971; ATALLAH; JOHNSON, 2004). Logo, o aumento do espaçamento entre plantas e a diminuição da densidade de plantas proporcionam maior aeração (FURLAN, 2012; LEITE; 2005), o que

evita a formação de um microclima favorável à doença, além de diminuir a possibilidade de contato entre plantas doentes com plantas saudáveis que estão na proximidade (LEITE, 2005). Contudo esta prática nem sempre resulta em incremento no rendimento.

A combinação de espaçamento entre fileiras largo (0,75 m) e densidade de plantas baixa (6 plantas/m) é uma estratégia promissora para o manejo do mofo-branco no feijoeiro quando não se aplica fungicida. A produtividade foi maximizada quando se aplicou fungicida no espaçamento de 0,5 m associado à 6 plantas m⁻¹ (VIEIRA et al., 2012).

Adubações excessivas de nitrogênio devem ser evitadas em áreas com histórico da doença, pois os tecidos das plantas podem se tornar mais suscetíveis ao patógeno (LEITE, 2005). Com relação ao local de semeadura, deve-se dar preferência para áreas sem histórico da doença, sendo esta medida essencial para campos de produção de sementes, além de priorizar o cultivo em locais bem drenados e ensolarados (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

2.7.4 Uso de cultivares tolerantes

Algumas cultivares, tanto de soja como de feijão, mostram certa tolerância à doença no campo, especialmente as de porte ereto, por permitirem maior circulação de ar e insolação e reduzirem o contato da folhagem e das vagens com os restos de cultura na superfície do solo. Existem cultivares e linhagens que apresentam resistência parcial à doença. As flores em senescência funcionam como “alimento” do patógeno para infectar as plantas, logo o controle do mofo-branco pode ser facilitado com o uso de cultivares que concentrem a floração em período curto, ao contrário de algumas que permanecem com flores (e risco de infecções primárias) por cerca de 40 dias (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

2.7.5 Adoção do sistema de plantio direto na palha

A intensidade do mofo-branco é menor no plantio direto que no plantio convencional, ou seja, com aração e gradagens. As operações de arar e gradear apenas irão revolver e descompactar o solo, não enterrando os escleródios e favorecendo sua disseminação na gleba. No caso de uma subsolagem profunda, pode ocorrer uma

redução da fonte de inóculo, deixando os escleródios a uma maior profundidade, não permitindo o desenvolvimento do apotécio.

O plantio direto tem efeito desfavorável sobre o mofo-branco em curto e em longo prazo. Em curto prazo, os efeitos advêm da palhada, que, para proporcionar máximo benefício, deve ter mais de 6 cm de espessura. Ela reduz a intensidade da doença ao impedir que a planta entre em contato com o solo contaminado (através das folhas e vagens) ou que a estipe alcance a superfície e forme apotécio, dificultando ou evitando a liberação dos ascósporos (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Em longo prazo, os escleródios que se desprendem das plantas durante a colheita ficam posicionados na camada superficial do solo e pelo fato da palhada acumular mais matéria orgânica e nutrientes, estimula a proliferação de antagonistas do patógeno. Estes, auxiliados pelas grandes oscilações de umidade e temperatura, diminuem a viabilidade dos escleródios, que teriam vida mais longa se enterrados (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Em condições de campo, escleródios podem ser atacados e degradados por microparasitas como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma virens*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *Talaromyces flavus*, *Ulocladim atrum* e *Fusarium* spp. (ETHUR et al., 2005) e dezenas de outros microrganismos (ADAMS; AYERS, 1979; BAE; KNUDSEN, 2007; MELO et al., 2006).

Napoleão et al. (2005) detectaram cerca de 4 vezes mais escleródios no resíduo da trilhadora no plantio convencional que no plantio direto após o cultivo do feijão, o que supõe-se que a produção de inóculo para as safras subseqüentes no plantio direto é menor que no plantio convencional.

2.7.6 Controle Biológico

O controle do mofo-branco com microrganismos é uma estratégia de controle para *S. sclerotiorum*, e pode ser aplicado de duas formas distintas. A primeira é consequência do manejo de palhada no sistema plantio direto que permite o aporte de matéria orgânica no solo, viabilizando o aumento da atividade de antagonistas (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

Outra possibilidade de se obter o controle biológico é por antagonistas selecionados e formulados para aplicação a campo, visando o controle do mofo-branco e de outras doenças causadas por patógenos habitantes do solo. A aplicação

de antagonistas deve ser feita antes da germinação dos escleródios quando se encontra em repouso na superfície do solo, por estar mais vulnerável ao ataque.

Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam-se como potenciais agentes de biocontrole, por diversas características, dentre as quais pode-se citar o rápido crescimento micelial, a alta produção de conídios, a síntese de substâncias antimicrobianas e a capacidade de sobreviver como saprófita, simbionte ou como microparasita (ALVARENGA et al., 2007). Paula Júnior et al. (2012) concluíram que aplicações de *Trichoderma* não são recomendadas para o controle do mofo-branco do feijoeiro no outono-inverno em regiões com temperaturas média abaixo de 20 °C, por ser uma condição considerada mais favorável ao desenvolvimento do patógeno que para o antagonista.

De acordo com Paula Júnior et al. (2010), o fungo *Coniothyrium minitans* é considerado um importante agente de controle biológico em diversos países, entretanto, nas condições brasileiras, não há estudos sobre sua utilização no controle do mofo-branco.

2.7.7 Controle Químico

O uso de fungicidas para controle do mofo-branco tem sido o método mais usado devido à falta de resistência genética em suas hospedeiras (BARDIN; HUANG, 2001). Contudo, o uso continuado de fungicidas é preocupante quanto ao desenvolvimento de variantes do patógeno resistentes aos produtos disponíveis no mercado.

O uso de fungicidas para controle do fungo *S. sclerotiorum* em feijão já foi avaliado em vários trabalhos, mas o controle tem sido inconsistente devido à dificuldade de obter boa cobertura com os fungicidas e de aplicá-lo no momento oportuno em relação a liberação de ascósporos (NIEDEBALKI; RICKARD, 1969; MORTON, HALL, 1989; BECKMAN, PARSONS, 1965; GABRIELSON et al., 1971; HUNTER et al., 1978; VARNER, 1986; KERR et al., 1992; MANANDHAR et al., 1998; STEADMAN, 1979; MUELLER et al., 2002). O nível de controle é diretamente proporcional ao número de flores que são tratadas com fungicidas (MORTON; HALL, 1989).

A simples presença de apotécios no campo, não deve ser um fator determinante para a aplicação de fungicidas. Tal prática deve resultar da presença

concomitante de flores e de inóculo. O conhecimento da importância das flores do feijoeiro na epidemiologia do mofo-branco é a chave para o seu controle químico (VIEIRA; 1994).

A primeira aplicação do fungicida é realizada antes da floração pois, de acordo com alguns autores (SCHWARTZ; STEADMAN, 1978; SUN; YANG, 2000; MUELLER et al., 2004), as pétalas das flores são os primeiros órgãos infectados pelos esporos do mofo-branco. As aplicações subsequentes podem basear-se nos fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento da doença.

Fungicidas podem ser aplicados com adjuvantes para melhorar o desempenho do produto e ou da aplicação, incluindo persistência do ingrediente ativo sobre a folhagem (HART et al., 1992; KUDISK et al., 1991; REDDY; LOCKE, 1996), além de cobertura da calda, absorção do produto, translocação do ingrediente ativo e eficácia (GENT et al., 2003).

Escleródios são as estruturas de resistência do fungo e a germinação na forma de apotécio ocorre sempre que as condições do solo estão úmidas e o dossel da cultura fechada (SCHWARTZ; STEADMAN, 1978; SUN; YANG, 2000). Os ascósporos que atingem as pétalas, germinam e formam o micélio que coloniza as pétalas, especialmente aquelas que estão aderidas a pequenas e recentes vagens emergidas nos nós mais baixos (ABAWI; GROGAN, 1975; SUTTON; DEVERALL, 1983; BOLAND; HALL, 1988; GRAU, 1988). Por isso, é essencial que a aplicação de fungicidas seja no momento adequado e diretamente para se obter uma completa cobertura das pétalas das flores, especialmente aquelas localizadas nos nós mais baixos para alcançar o controle da *S. sclerotiorum*.

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) há fungicidas registrados para o controle de mofo-branco do feijão e da soja, alguns registrados para o feijão e não registrados para a soja. Os ingredientes ativos (grupo químico) registrados são: fluazinam (fenilpiridinilamina), tiofanato-metílico (benzimidazol), clorotalonil + tiofanato-metílico (isoflotalonitrila + benzimidazol), fluazinam + tiofanato metílico (fenilpiridinilamina + benzimidazol), procimidona (dicarboximida) e cloreto de benzalcônios (amônio quaternário) (AGROFIT, 2015). Além desses, boscalida (anilida) está liberado no controle de mofo-branco no feijoeiro (SEAB, 2015).

Segundo Vieira et. (2010), duas aplicações de fungicidas para controle do mofo-branco podem dobrar a produtividade do feijoeiro. Entretanto, o alto

custo e o possível efeito prejudicial para o ambiente e para os humanos têm motivado pesquisas para obtenção de novas opções para manejo do mofo-branco.

A aplicação aérea, embora não cause danos mecânicos às plantas, não proporciona bons resultados, por causa do baixo volume de calda empregado (TU, 1989).

2.7.7.1 Modo e mecanismo de ação dos fungicidas

Fluazinam é considerado um dos mais efetivos no controle de *S. sclerotiorum* (LEMAY et al., 2002; MATHEROM; PORCHAS, 2004; VIEIRA et al., 2012; MAHONEY et al., 2014, apud LEHNER et al., 2015). O fungicida fenilpiridinaminas fluazinam é considerado um fungicida de proteção, que deve ser aplicado antes do início dos sintomas da doença para melhores resultados (BUTZLER et al. 1998). O fluazinam atua como desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, impedindo a síntese de ATP (GUO et al., 1991; VITORATOS, 2014). Como o fluazinam tem amplo espectro de ação, este fungicida tem um baixo risco de desenvolver resistência (MA; MICHAILIDES, 2005).

O fungicida procimidona é também efetivo e frequentemente utilizado no controle do mofo-branco. Seu modo de ação pode ser preventivo ou curativo, com moderada atividade sistêmica, sendo absorvido pelas raízes e translocado para as folhas e flores (CHEN et al., 2010). Esse fungicida atua na rota do citocromo C dentro da mitocôndria. Devido ao mecanismo de ação específico, esse dicarboximida é considerado um fungicida de alto risco para desenvolvimento de resistência (MA; MICHAILIDES, 2005).

Os benzimidazóis são fungicidas sistêmicos que contêm diferentes ingredientes ativos (benomyl, tiofanato metílico, debacarb e carbendazim) com o mesmo mecanismo de ação específico, inibindo a síntese da β -tubulina (proteína pertencente ao tubo mitótico) e, desta forma, reduzem a formação de microtúbulos prejudicando a divisão celular e nuclear (CHEN et al., 2009; DAVIDSE, 1986; QUELLO et al., 2010; WONG et al. 2008). Resistência aos fungicidas benzimidazóis pode ocorrer por uma mudança no nucleotídeo no gene da β - tubulina (MA; MICHAILIDES, 2005) e o risco de desenvolvimento de resistência é considerado alto (WONG et al., 2008).

2.7.7.2 Propriedades físico-químicas dos fungicidas

O ingrediente ativo fluazinam foi comercializado pela primeira vez em 1990 e apresenta as seguintes características físico-químicas: adsorção $K_{oc} = 1705-2316$; solubilidade em água = $0,135 \text{ mg L}^{-1}$ (pH 7, 20 °C) (TOMLIN, 2003); $K_{ow} \log P = 4,03$; $pK_a = 7,34$ (20 °C) (MACBEAM, 2012). O produto comercial utilizado nos experimentos foi o Legacy®, produto este que apresenta estado físico líquido, cor amarelo, odor característico, pH 6,24 (25 °C), solubilidade de 173 mg L^{-1} em água (ARYSTA, 2016a).

O ingrediente ativo procimidona apresenta as seguintes características físico-químicas: $K_{ow} \log P = 3,14$ (26 °C); solubilidade em água = $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ (25 °C); persistente no solo por 4-12 semanas (MACBEAN, 2012). O produto comercial utilizado nos experimentos foi o Sumiguard 500 WP, produto este que apresenta estado físico sólido, em forma de pó, cor bege, odor característico, pH $5,23 \pm 0,18$ (m/v) (25 °C), densidade menor que $0,4 \text{ g mL}^{-1}$ (ARYSTA, 2016b).

O fungicida carbendazim apresenta as seguintes propriedades físico-químicas: adsorção $K_{oc} = 200-250$, $K_{ow} \log P = 1,38$ (pH 5), 1,51 (pH 7), 1,49 (pH 9); $pK_a = 4,2$ (20 °C); solubilidade em água = 29 mg L^{-1} (pH 4), 8 mg L^{-1} (pH 7), 7 mg L^{-1} (pH 8) (24 °C) (MACBEAN, 2012).

O ingrediente ativo tiofanato metílico apresenta as seguintes propriedades físico-químicas: adsorção no solo $K_d = 1,2$; $K_{ow} \log P = 1,44$; $pK_a = 7,28$; praticamente insolúvel em água (20 °C); persistência de 3-4 semanas no solo (MACBEAN, 2012).

2.7.7.3 Fungigação

Em todos os sistemas de produção é necessário otimizar o uso dos recursos produtivos, e esta otimização é obtida por meio de altas produtividades e redução dos custos de produção. Logo, conciliar o uso da técnica de irrigação e a aplicação de produtos fitossanitários se tornam fundamentais se o objetivo é a obtenção de altos rendimentos. A técnica de quimigação, aplicação de produtos químicos pela água de irrigação, é uma combinação dessas duas técnicas (BASANTA et al., 2000).

Fungigação é um método de controle de doenças fúngicas em plantas mediante a aplicação de fungicidas pelo sistema de irrigação por aspersão convencional, pivô central, gotejamento, autopropelido etc. Essa prática tem se mostrado,

na maioria dos casos, eficiente e segura (Pinto, 1994). No entanto, tem sido adotada sem um adequado embasamento científico sobre o período residual dos fungicidas na cultura de interesse econômico.

Uma das vantagens da fungigação é que os fungicidas com solubilidade em água (hidrofílicos) são injetados na tubulação do pivô central e formam uma emulsão, o que pode compensar, dentre outros fatores, o alto volume de água na aplicação, garantindo a eficiência do sistema. Outra vantagem da fungigação, específica no controle do mofo-branco, refere-se ao alcance do produto na superfície do solo, atingindo diretamente o alvo (micélio, escleródios ou apotécios), sejam os químicos ou biológicos, ou no caso dos fungicidas sistêmicos pela possibilidade de absorção do produto também pelas raízes. Além de reduzir muito o custo de aplicação do fungicida, essa técnica não causa compactação do solo e danos mecânicos às plantas, e, dependendo do fungicida, proporciona melhor controle de patógenos de solo que os métodos convencionais (VIEIRA; SUMNER, 1999).

Entre os fungicidas mais indicados e eficientes para serem usados na fungigação para controle do mofo-branco estão os ingredientes ativos procimidona e o fluazinam.

A técnica da fungigação é eficiente no controle de muitas outras doenças, além do mofo-branco, mesmo com volume de água superior a 50.000 L ha⁻¹ (VIEIRA; SUMNER, 1999). Segundo esses autores, a redução do resíduo de fungicida no alvo, causada pelo grande volume de água usada na fungigação, em relação aos métodos convencionais, pode ser compensada, pelo menos em parte, pelos seguintes fatores: melhor distribuição do fungicida no dossel das plantas, maior redução do inóculo na planta e no solo, absorção dos fungicidas sistêmicos pelas raízes, e melhor uniformidade de distribuição do produto pelo pivô-central.

Segundo Vieira e Sumner (1999), a tendência é que a eficiência do ingrediente ativo diminua com o aumento da lâmina d'água, sobretudo acima de 8 mm. Segundo Geary et al. (2004), a utilização de lâminas d'água menores durante a quimigação podem aumentar a eficiência de deposição do fungicida na folhagem, aumentando, consequentemente a atividade residual do fungicida.

Em um estudo sobre a eficácia do fungicida epoxiconazol aplicado por pivô central no feijoeiro, avaliou-se a eficiência do fungicida nas lâminas de água de 3, 5 e 7 mm e, se constatou que a severidade da mancha angular e da mancha de alternaria do

feijoeiro foi reduzida em todos os tratamentos e as lâminas d'água não influenciaram na eficácia do fungicida epoxiconazol (CUNHA et al., 2001).

Pinto e Costa (1999) realizaram a fungigação para o controle da ferrugem no feijoeiro, e constataram a viabilidade deste método, bem como a eficácia do fungicida bitertanol no controle da ferrugem. Tolentino Júnior et al. (2011) obtiveram bom controle de pinta preta (*Alternaria solani*) do tomateiro com fungicidas sistêmicos azoxistrobina, difenoconazol, metiram+piraclostrobina e tebuconazol aplicados por fungigação em gotejamento, e as produtividades nos tratamentos com fungigação foram semelhantes às obtidas com pulverizações convencionais.

Vieira et al. (2003) avaliaram a quimigação com benomil e fluazinam e seus efeitos no solo sobre o controle do mofo-branco em feijoeiro e, verificaram que a quimigação proporcionou controle do mofo-branco no feijoeiro semelhante ao obtido com a pulverização, resultando também em produtividades similares.

Botelho e Costa (1997) avaliaram o efeito do número de aplicações por pivô central com lâmina de 6 mm (uma ou duas aplicações aos 45 e 60 dias após a emergência) dos fungicidas procimidona e fluazinam no controle do mofo-branco em feijoeiro, e constaram que os melhores níveis de redução da doença foram obtidos com duas aplicações dos fungicidas e que todos os tratamentos melhoraram a qualidade sanitária das sementes e reduziram de duas a dez vezes o número de escleródios residuais. Da mesma forma, Venegas e Saad (2010), avaliaram a eficiência do fungicida procimidona, aplicado por fungigação (lâminas d'água de 5,5 e 11 mm) e via pulverizador automotriz (120 e 200 L ha⁻¹) no controle do mofo-branco no feijoeiro. Os autores verificaram que a produtividade na testemunha reduziu em torno de 25%, mas este parâmetro não diferiu entre os tratamentos. Porém, melhores resultados de controle da doença, menor número de apotécios por m² e menor peso dos escleródios residuais na colheita foram obtidos na aplicação por fungigação, independente da lâmina aplicada (VENEGAS; SAAD, 2010).

Outro trabalho que verificou a eficiência de fungicidas aplicados por irrigação sobre o controle de mofo-branco em feijoeiro foi realizado por Vieira et al. (2001). Os autores constataram que a aplicação do fungicida fluazinam apenas sobre o solo mostrou-se eficiente na redução da incidência de plantas doentes, talvez por inibir a formação de apotécios. Estes autores também relataram que a maior média de rendimento foi alcançada com o fluazinam aplicado com pulverizador costal (2.054 kg ha⁻¹), mas este

tratamento não diferiu significativamente dos tratamentos aplicados por água de irrigação para fluazinam e benomil, o que demonstrou que a aplicação do fluazinam e do benomil pela água de irrigação foi eficiente no controle do mofo-branco. Já Oliveira et al. (1995) verificaram que a fungigação (31.000 L ha⁻¹) foi tão ou mais eficiente no controle do mofo-branco que a aplicação de fungicidas por pulverização (300 L ha⁻¹).

2.7.8 Medidas alternativas de controle

Outras medidas para o manejo do mofo-branco podem ser utilizadas. Entre elas, destacam-se a eliminação de plantas daninhas, as quais podem ser hospedeiras do patógeno (DORRANCE; MILLS, 2008); a solarização do solo, por diminuir o potencial de inóculo pois é uma técnica eficiente na eliminação de escleródios, porém seu uso é limitado para pequenas áreas (PAULA JÚNIOR et al., 2010); e utilização de indutores de resistência em plantas ao ataque do fungo (MARCUCCI et al., 2010; MOLLOY et al., 2004).

Adams (1975) concluiu que a temperatura do solo de 35 °C constante por 3 semanas ou mais reduz a sobrevivência de escleródios. Uma solarização de 8 semanas também reduz a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* enterrados no solo a uma profundidade de 10 cm (SWAMINATHAN et al., 1999).

A combinação de alta temperatura (25 °C) com redução do oxigênio (0,1%) em campos irrigados (alta umidade do solo) contribui para diminuir a sobrevivência de espécies do gênero *Sclerotinia* (*S. minor* e *S. sclerotiorum*) (WU et al., 2008).

2.8 Métodos para avaliação do residual de fungicidas

Atualmente, existe a recomendação oficial para aplicação de fungicidas para o controle das doenças fúngicas. Porém, faltam informações a respeito do período residual dos produtos fitossanitários em relação às doenças de final de ciclo, para definição do melhor momento (estádio) para aplicação do fungicida (KLINGELFUSS; YORINORI, 2001).

Métodos de análises por cromatografia e métodos indiretos têm sido usados para estimar o período residual dos produtos fitossanitários.

2.8.1 Método da Cromatografia

O método da cromatografia é utilizado para avaliar a concentração do produto em partes comestíveis. Porém, este método é geralmente utilizado por empresas multinacionais para registrarem um novo produto ou o uso de um produto em outra cultura no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Métodos analíticos como cromatografia de gás (gas chromatography - GC) e cromatografia líquida de alta performance (high performance liquid chromatography - HPLC) têm sido aceitos como técnicas precisas para análise de resíduos de produtos fitossanitários em amostras agrícolas, porém dispendiosas e que exigem significativos investimentos laboratoriais. Estas técnicas analíticas geralmente requerem etapas críticas como extração de solvente fase líquido-líquido e uma série de procedimentos com assepsia para a preparação das amostras (LI et al., 2007). A metodologia de Quechers ganhou significativa popularidade desde seu desenvolvimento e publicação (WILKOWKA; BIZIUK, 2011).

Por isso, é essencial encontrar um método simples para a determinação rápida de resíduos de produtos fitossanitários e o *Detached leaf assay* tem potencial para ser utilizado para investigar indiretamente o resíduo de fungicidas utilizados para controle do mofo-branco.

2.8.2 Incidência e severidade do mofo-branco

A avaliação da incidência e da severidade do mofo-branco pode indicar indiretamente como a atividade residual dos ingredientes ativos está diminuindo, pois é pela incidência e severidade da doença que se observa a eficiência da aplicação, a qual depende sobretudo da época de aplicação (OLIVEIRA, 2005).

A intensidade da doença pode ser calculada pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Essa é a melhor representação de uma epidemia, pois caracteriza a interação entre o patógeno, o hospedeiro e o ambiente (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

Em avaliação sobre a incidência e severidade de três fungicidas (tiofanato metílico, fluazinam e procimidona) nos estádios R_{5.1}, R_{5.3} e R_{5.5}, observou-se que os fungicidas não apresentaram eficiência em relação à incidência da doença, mas o controle químico reduziu significativamente a severidade do mofo-branco na cultura da soja (CARDOSO et al., 2015).

2.8.3 *Straw test* (ST)

O *straw test* (teste do canudinho) tem sido utilizado em vários projetos para a seleção de diferentes isolados de mofo-branco para estudo de agressividade dos isolados e também em diferentes cultivares de feijoeiro, visando localizar cultivares resistentes/suscetíveis ao patógeno (OTTO-HANSON et al., 2011).

O *Straw test* é um método destrutivo, pois para a condução do experimento, deve-se cortar a planta de feijoeiro entre o quarto e quinto nó para inocular o fungo *S. sclerotiorum*. Notas são atribuídas de acordo com a difusão do patógeno no ramo oito dias após a inoculação do fungo (OTTO-HANSON et al., 2011).

2.8.4 *Detached Leaf Assay* (DLA)

O DLA (método da folha destacada) já foi utilizado em experimentos para estudos de resistência de *S. sclerotiorum* na soja (KIM et al., 2000; KULL et al., 2004) e em feijão e soja (KULL et al., 2003).

Até o momento, um trabalho utilizou o DLA para avaliar a eficiência de quatro ingredientes ativos (benomyl, tebuconazol, vinclozolin e tiofanato metílico) no controle do mofo-branco em folhas de soja, coletadas um dia após a pulverização (MUELLER et al., 2002). Esses autores observaram que o tiofanato metílico e vinclozolin preveniram a colonização inicial do micélio do fungo *S. sclerotiorum*. Potencialmente, o DLA pode ser utilizado para avaliar indiretamente a atividade residual de fungicidas no controle da *S. sclerotiorum*.

O DLA é um método mais adequado para condução de experimentos a campo quando comparado ao *straw test* (ST). Alguns motivos do DLA se adequar melhor para experimentos à campo são: I) o DLA é mais rápido de ser conduzido, pois enquanto o DLA dura 48 horas após a inoculação do fungo, o ST precisa de 8 dias para avaliação após a inoculação; II) o ST é um teste destrutivo, pois a planta é cortada entre o 4º e 5º nó e o fungo vai se desenvolver nos ramos, levando a planta à morte, enquanto para o DLA é necessário a retirada de apenas uma folha da planta do feijoeiro ou soja; III) o DLA é uma avaliação mais objetiva, pois é calculado a área lesionada em cm² pelo program “Image J” e o ST é uma avaliação mais subjetiva (OTTO-HANSON et al., 2011).

Capítulo I “ MÉTODOS INDIRETOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RESIDUAL DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DO MOFO-BRANCO EM FEIJOEIRO”

Thomas José Justo Miorini¹, Carlos Gilberto Raetano¹

¹Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas / UNESP / Campus de Botucatu, Rua José Barbosa de Barros, nº 1780, CEP: 18.610-307 – Botucatu, SP, Brasil.

Autor para correspondência: Carlos G. Raetano, raetano@fca.unesp.br

MIORINI, T. J. J., RAETANO, C. G. Detached leaf test para avaliação do residual de fungicidas no controle do mofo-branco no feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, v. X, n. X, p. XXX-XXX, 201X.

RESUMO

O mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* é uma doença bastante difundida nas regiões produtoras de feijão, e que limita o potencial produtivo. Para o seu controle, é recomendado o manejo integrado da doença, no entanto, prevalece o controle químico. Três experimentos foram conduzidos com objetivos de: avaliar o efeito de lâminas d'água sobre período residual de fungicidas e a produtividade correspondente (experimento I – casa-de-vegetação), comparar os métodos *Detached Leaf Assay* (DLA) e *Straw Test* (ST) quanto ao período residual de fungicidas (experimento II – casa-de-vegetação) e verificar se o DLA pode ser utilizado para avaliar a eficiência de fungicidas, não registrados para o patógeno, mas utilizados na cultura do feijão, sobre o mofo-branco (experimento III – campo). No experimento I, três fungicidas foram aplicados intercaladas

com três lâminas d'água, em duas cultivares de feijoeiro, com o fluazinam e o procimidona demonstrando atividade residual mais prolongado quando comparado com o tiofanato metílico; não houve influência das lâminas d'água no período residual dos fungicidas, tampouco no controle do mofo-branco; maior produtividade foi obtida com a cultivar IPR-Tangará quando comparada à cultivar IAC-Alvorada. No experimento II, o DLA mostrou-se o método mais adequado para avaliação da atividade residual de fungicidas e para uso a campo quando comparado ao *straw test*. Já no experimento III, concluiu-se que o DLA pode ser utilizado para avaliar o efeito sobre o mofo-branco de produtos fitossanitários não-registrados para este patógeno ou novos ingredientes ativos.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phaseolus vulgaris* L., fluazinam, procimidona, método da folha destacada

“INDIRECT METHODS TO INVESTIGATE THE FUNGICIDES RESIDUES FOR
WHITE MOLD CONTROL IN DRY BEAN”

ABSTRACT

White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) is a widespread disease in bean producing regions, and is a devastating disease that limits yield potential. For white mold control, it is necessary to use an integrated management approach, but use of fungicides is common. Three experiments were conducted with the following objectives: evaluate the effect of water levels on residual activity of fungicides and corresponding yield (experiment I – greenhouse); compare two methods to investigate residual activity of fungicides: detached leaf assay (DLA) and straw test (ST), (experiment II – greenhouse); and verify if DLA can be use to investigate the residual activity of fungicides on *S. sclerotiorum*, which are not registered for white mold, but used in dry bean. In experiment I, three fungicides were applied with three water levels, in two dry bean cultivars, and results showed: residual

activity of fluazinam and procymidone sustained longer when compared to thiophanate methyl; there was no influence of water levels on residual activity of fungicides and white mold control; IPR-Tangará cultivar had higher yield than IAC-Alvorada cultivar. In experiment II, DLA was more suitable for investigating residual activity of fungicides and for use in field when compared with straw test. In experiment III, it was concluded that DLA can be used to evaluate the effect on *S. sclerotiorum* of fungicides that are not registered for this pathogen or that represent new active ingredients.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phaseolus vulgaris* L., fluazinam, procymidone, detached leaf assay

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), com produção média de 3,5 milhões de toneladas. A produção nacional de feijão na safra 2013/2014 foi de 3,45 milhões de toneladas e deverá ficar em 3,41 milhões de toneladas na safra 2014/2015, o que corresponde à uma redução de 1,1% em relação à última temporada. O feijoeiro é cultivado em todo território nacional por pequenos e grandes produtores (MAPA, 2015).

O cultivo do feijoeiro no Brasil é realizado em três épocas distintas: 1ª safra – safra das “águas” – semeadura de setembro a novembro; 2ª safra – safra da “seca” – semeadura de janeiro a março; e 3ª safra – safra de inverno – semeadura de abril a junho. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015), considerando as três safras, a área total de feijão na safra 2013/2014 foi de 3,37 milhões de hectares e a estimativa é que a safra 2014/2015 seja menor em 7% que a safra anterior, com um total de 3,13 milhões de hectares.

A cultura do feijão é afetada por vários tipos de patógenos os quais acarretam perdas significativas na produção. Dentre as doenças do feijoeiro, destaca-se o mofo-branco, causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, que tem ampla distribuição geográfica e causa problemas em várias culturas (HARTMAN et al., 1999).

O uso de fungicidas para controle do mofo-branco tem sido o método mais usado devido à falta de resistência genética em seus hospedeiros (BARDIN; HUANG, 2001). Contudo, o uso continuado de fungicidas é preocupante quanto ao desenvolvimento de variantes do patógeno resistentes aos produtos disponíveis no mercado. Recomendações de manejo integrado para o controle desse fungo é o mais indicado visando diminuir a ocorrência de resistência.

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) há fungicidas registrados para o controle de mofo branco do feijão, com os seguintes ingredientes ativos (grupo químico) registrados: fluazinam (fenil-piridinamina), tiofanato-metílico (benzimidazol), clorothalonil + tiofanato-metílico (isofalotril + benzimidazol), fluazinam + tiofanato metílico (fenil-piridinamina + benzimidazol), iprodiona (dicarboximida), procimidona (dicarboximida) (AGROFIT, 2015).

Dos fungicidas registrados para o controle do mofo-branco no feijoeiro, o fluazinam e o procimidona são os mais usados frequentemente por produtores brasileiros (LEHNER et al. 2015). Fluazinam é considerado um dos mais efetivos no controle da *S. sclerotiorum* (LEMAY et al. 2002; MATTHEROM; PORCHAS, 2004; VIEIRA et al. 2012; MAHONEY et al. 2014). O fungicida fenil-piridinaminas fluazinam é considerado um fungicida de proteção, que deve ser aplicado antes do início dos sintomas da doença para melhores resultados (BUTZLER et al. 1998). O fluazinam atua como desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, impedindo a síntese de ATP (GUO et

al. 1991; VITORATOS, 2014). Como o fluazinam tem amplo espectro de ação, este fungicida tem baixo risco de desenvolver resistência (MA; MICHAILIDES, 2005).

O fungicida procimidona é também efetivo e frequentemente utilizado no controle do mofo-branco. Seu modo de ação pode ser preventivo ou curativo, com moderada atividade sistêmica, sendo absorvido pelas raízes e translocado para as folhas e flores (CHEN et al. 2010). Esse fungicida atua na rota do citocromo C dentro da mitocôndria. Devido ao mecanismo de ação específico, esse dicarboximida é considerado como um fungicida de alto risco para desenvolvimento de resistência (MA; MICHAILIDES, 2005).

Métodos analíticos como cromatografia de gás (gas chromatography - GC) e cromatografia líquida de alta performance (high performance liquid chromatography - HPLC) têm sido aceitos como técnicas para análise de resíduos de produtos fitossanitários em amostras agrícolas. Estas técnicas analíticas geralmente requerem fases críticas como extração com solvente líquido-líquido e uma série de procedimentos com assepsia para a preparação das amostras (LI et al. 2007). Por isso, é essencial encontrar um método simples para a determinação rápida de resíduos de produtos fitossanitários e, o *Detached leaf assay* (DLA) tem potencial para avaliar indiretamente o resíduo de fungicidas no controle do mofo-branco.

O DLA e o *straw test* têm sido utilizados em experimentos para fazer a seleção de diferentes isolados de mofo-branco no estudo de agressividade dos isolados e também localizar cultivares resistentes/suscetíveis à *S. sclerotiorum*, ao inocular diferentes cultivares com o patógeno (OTTO-HANSON et al., 2011).

Um trabalho utilizou o DLA para avaliar a eficiência de quatro ingredientes ativos (benomyl, tebuconazol, vinclozolin e tiofanato metílico) no controle do mofo-branco em folhas de soja, coletadas um dia após a pulverização, (MUELLER et al.,

2002). Potencialmente, o DLA pode ser utilizado para avaliar indiretamente a atividade residual de fungicidas no controle da *S. sclerotiorum*, no entanto, há necessidade de mais estudos que confirmem este resultado.

As hipóteses em comum para os experimentos foram que o ‘*detached leaf assay*’ (DLA) pode ser utilizado para avaliar indiretamente o período residual de produtos fitossanitários e que os ingredientes ativos apresentam diferenças. As hipóteses exclusivas para o experimento I foram que a atividade residual de fungicidas diminui mais rapidamente em fungigação com lâminas d’água maiores; e a produtividade é influenciada pelos diferentes ingredientes ativos, mas não pelas diferentes lâminas d’água. A hipótese exclusiva para o experimento II foi que o uso do DLA é mais adequado que o *straw test* para avaliar a atividade residual de fungicidas. A hipótese exclusiva para o experimento III foi que fungicidas não registrados para a *S. sclerotiorum*, podem ter certo efeito supressivo sobre o patógeno, mas não comparável com os fungicidas registrados para tal controle.

Os objetivos do experimento I foram avaliar o efeito das lâminas d’água sobre o período residual em duas cultivares de feijoeiro, aos treze dias após a primeira pulverização e quatro dias após a segunda aplicação, assim como a produtividade final. O objetivo do experimento II foi comparar os métodos DLA e *straw test* no período residual dos fungicidas fluazinam e procimidona aplicados ao longo dos dias até completar 15 dias da primeira aplicação. Já o experimento III teve como objetivo verificar a adequação do método DLA para avaliar a eficiência de fungicidas não registrados para o controle do mofo-branco no feijoeiro em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I

O experimento I foi conduzido em casa-de-vegetação no Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP – Campus de Botucatu, SP. O solo utilizado no experimento apresenta as seguintes características: pH (CaCl₂): 6,1; MO: 12 g/dm³; P_(resina): 30 mg/dm³; Al³⁺: 0; H+Al: 20 mmol_c/dm³; K: 2,3 mmol_c/dm³; Ca: 37 mmol_c/dm³; Mg: 29 mmol_c/dm³; SB: 68 mmol_c/dm³; CTC: 87 mmol_c/dm³; V%: 78. Seis sementes de feijão foram semeadas por vaso com capacidade de 9 L de solo e, o desbaste de 50 % das plântulas foi realizado aos 10 dias após a germinação, permanecendo 3 plantas por vaso. Quatro adubações de cobertura foram realizadas com uréia e cloreto de potássio, e inseticidas pulverizados quando necessário.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 2 x 3 x 4 (2 cultivares de feijoeiro: IAC-Alvorada e IPR-Tangará; 3 lâminas de água: 3, 6 e 9 mm e 3 fungicidas: fluazinam a 1 L ha⁻¹ do produto comercial (p.c.), procimidona a 1 kg ha⁻¹ do p.c. e tiofanato metílico na dosagem de 70 g do p.c. em 100 L de água; mais um tratamento testemunha somente com variação nas lâminas d'água sem fungicida), totalizando 24 tratamentos com 6 vasos por tratamento.

A primeira aplicação dos fungicidas foi realizada quando 50% do feijoeiro estava em pleno florescimento e a segunda aplicação feita 15 dias após. Os vasos foram transferidos para o Laboratório de Tecnologia de Aplicação de Defensivos Agrícolas (LTADA) da FCA/UNESP/Botucatu e irrigados durante o tempo necessário para completar a lâmina d'água intercalada com o produto fitossanitário. Para a aplicação do produto fitossanitário utilizou-se a ponta de pulverização hidráulica de jato plano XR 110015 (Spraying Systems Co., Glendale Heights, IL) e para a aplicação da lâmina d'água

utilizou-se a ponta de pulverização hidráulica de jato plano de ângulo grande TK 10 (Spraying Systems Co., Glendale Heights, IL). A velocidade de aplicação do simulador de chuva foi de $0,5 \text{ km h}^{-1}$ e a velocidade de aplicação do fungicida foi de 3 km h^{-1} .

Como não foi possível aplicar o fungicida simultaneamente com a lâmina d'água, adotou-se o seguinte esquema para cada tratamento: aplicação de $\frac{1}{3}$ do volume d'água, correspondente à respectiva lâmina d'água (3, 6 e 9 mm), seguida da aplicação de $\frac{1}{3}$ do volume da calda contendo o produto fitossanitário e, repetindo este procedimento por mais duas vezes. Dessa forma, foram três aplicações de água intercaladas com a aplicação do produto fitossanitário para as respectivas lâminas d'água.

De cada vaso foi coletada apenas uma folha que correspondia a primeira folha completamente expandida mais próxima do ápice treze dias após a primeira aplicação e quatro dias após a segunda aplicação e foi conduzido o *Detached leaf assay* (DLA), que consiste na inoculação do micélio do fungo (*S. sclerotiorum*) nas folhas de feijoeiro.

Uma suspensão artificial de micélio de *S. sclerotiorum* foi inoculada nos vasos com o auxílio de um pulverizador manual com o objetivo de homogeneizar a incidência de mofo-branco. Para esta produção de micélio, 5 discos de 15 mm de diâmetro do isolado 978C (isolado coletado na cultura da soja, no município de Rio Verde/Goiás no ano de 2012 e armazenado no LTADA) foram colocados em meio de arroz em um erlenmeyer (200 g de arroz para 100 mL de água destilada, autoclavado 2 vezes à 120° C). Quatorze dias após a inoculação do micélio no erlenmeyer, adicionou-se 300 mL de água destilada para desprender o micélio do arroz. A mistura foi coada em peneira 28 mesh sendo posteriormente diluída em 1,0 L de água destilada para ser aplicada nas plantas de feijoeiro com aproximadamente 45 dias após a emergência. Ao final do experimento avaliou-se a produtividade.

Experimento II

O experimento II foi conduzido em vasos no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Agrícola (CPDA) – Arysta LifeScience, Pereiras, SP. O solo utilizado no experimento apresentava as seguintes características: pH (CaCl₂): 5,4; MO: 40 g/dm³; P_(resina): 334 mg/dm³; Al³⁺: 1,0; H+Al: 42 mmol_c/dm³; K: 10,5 mmol_c/dm³; Ca: 67 mmol_c/dm³; Mg: 21 mmol_c/dm³; SB: 98 mmol_c/dm³; CTC: 140 mmol_c/dm³; V%: 70.

Sementes de feijoeiro do grupo carioca, cultivar IAC-Alvorada, foram semeados em vasos de 1 L, e 20 dias após a semeadura, realizou-se a primeira pulverização. O delineamento experimental em casa-de-vegetação foi inteiramente ao acaso e os tratamentos foram pulverizados com 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 6, 5, 4, 3 dias antes da coleta das folhas, mais 10 plantas sem aplicação de fungicida (testemunha), com 10 repetições por tratamento.

Os fungicidas fluazinam e procimidona foram aplicados na dosagem recomendada do produto comercial sendo respectivamente de 1,0 L ha⁻¹ e de 1,0 kg ha⁻¹ do produto comercial.

A aplicação convencional foi feita com auxílio de um pulverizador pressurizado por CO₂, portando barra de 2,5 metros, com pontas de pulverização de jato plano simples Teejet XR 11004 (Spraying Systems Co., Glendale Heights, IL) espaçadas de 0,5 m e volume de calda de 1000 L ha⁻¹, volume este recomendado na bula dos fungicidas para controle do mofo-branco do feijoeiro. Os dez vasos de cada tratamento foram colocados de maneira linear para favorecer a aplicação.

A primeira folha completamente expandida mais próxima do ápice, de cada uma das 10 plantas de cada tratamento, foi destacada para a condução do DLA. Estas mesmas plantas foram cortadas entre o 4º e 5º nó para condução do *straw test*.

Experimento III

O experimento foi conduzido a campo no CPDA – Arysta LifeScience, em Pereiras, SP, no ano de 2014. Os produtos foram aplicados com volume de calda de 1000 L ha⁻¹, volume de calda recomendado para o controle do mofo-branco do feijoeiro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os tratamentos distribuídos em parcelas subdivididas no tempo e a pulverização de cada ingrediente ativo foi realizada em uma área de 2,5 x 4 m, totalizando 10 m². Para condução do DLA, 10 folhas de cada tratamento foram coletadas e encaminhadas para o laboratório com 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a pulverização para avaliar o efeito dos ingredientes ativos sobre o mofo-branco no decorrer dos dias.

Os ingredientes ativos, grupo químico, concentração do ingrediente ativo no produto comercial (p.c.) e dose utilizada do p.c. foram: fluazinam (fenilpiridinamina; 500 g L⁻¹; 1,5 L ha⁻¹), procimidona (dicarboximida; 500 g kg⁻¹; 1,5 kg ha⁻¹), hidróxido de fentina (organoestânico, 400 g L⁻¹; com duas doses distintas: 0,4 L e 1,0 L ha⁻¹), piraclostrobina (estrobilurina; 250 g L⁻¹; 0,3 L ha⁻¹), tetraconazol (triazol; 125 g L⁻¹; 0,8 L ha⁻¹), clorotalonil (nitrila; 500 g L⁻¹; 2,5 L ha⁻¹), piraclostrobina + metconazol (estrobilurina + triazol; 130 + 80 g L⁻¹; 0,5 L ha⁻¹ do p.c.), além da testemunha sem aplicação de produto.

Detached Leaf Assay (DLA)

A infecção primária de plantas de feijoeiro é causada por ascósporos que colonizam as flores (ABAWI et al., 1975), mas infecções secundárias podem também ocorrer em folhas, pecíolos e ramos pelo contato direto das flores infectadas com os tecidos adjacentes das plantas. O procedimento de inoculação utilizado nesse estudo com discos do meio de cultura contendo micélio do patógeno foi similar à infecção natural do tecido

vegetal resultante do contato direto com o patógeno. Portanto, o controle da taxa de crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum* pelo DLA mostra o potencial que estes fungicidas têm em controlar a infecção secundária, o que inibe a disseminação da doença.

Após a coleta das folhas de cada experimento, estas foram encaminhadas para o laboratório para condução do DLA. O delineamento do DLA foi de blocos incompletos parcialmente balanceados em laboratório.

Quatro folhas de feijão foram colocadas em bandejas “D100” (515 mm x 355 mm x 73 mm), mantendo o trifólio central de cada folha acondicionado sobre uma placa de Petri de vidro, as quais estavam sobre toalhas de papel. Cada pecíolo das folhas foi colocado em um tubo de ensaio (12 x 75 mm), e fechado com uma tampa de batoque contendo um orifício central para permitir a entrada do pecíolo da folha. Após a inoculação do fungo, adicionou-se aproximadamente 300 mL de água e a bandeja foi vedada com filme de PVC para manter o ambiente interno em câmara úmida, e o ambiente do laboratório foi mantido à 25 ± 2 °C.

Para a condução do DLA utilizou-se escleródios do isolado 978C (cultura da soja, Rio Verde, GO, 2012) para o experimento I e o isolado 972B (feijão, Pereiras, SP, 2012) para os experimentos II e III, isolados que estavam depositados no LTADA à 4° C. Os isolados foram reativados por um escleródio em meio de cultura ágar-água, e após 5 a 7 dias repicado para meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

Após 48 horas de crescimento em BDA, um disco de 6 mm de diâmetro foi inoculado em cada trifólio central com a parte micelial do meio em contato com a folha e as avaliações foram realizadas 24, 30, 36, 42 e 48 horas (experimento I); 24, 36 e 48 horas (experimento II) e 48 horas (experimento III) após a inoculação do patógeno com o auxílio de uma máquina digital. As fotos da área lesionada foram analisadas pelo programa “Image J” (Image J 1,45s, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA)

para auxiliar na “leitura” do tamanho da área lesionada em cm². Após a “leitura”, foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para os experimentos I e II, através da integração trapezoidal, apresentada na Equação 1 (SHANER; FINNEY, 1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[\frac{X_{i+1} + X_i}{2} \right] * (t_{i+1} - t_i)$$

Em que,

X_i = área lesionada avaliada na i ésima observação; X_{i+1} = área lesionada avaliada na observação $i+1$; t_i = tempo (horas) na i ésima avaliação; t_{i+1} = tempo (horas) na avaliação $i+1$;

n = número total de avaliações.

Straw Test (ST)

Para o experimento II também foi conduzido o *straw test* para avaliar a atividade residual dos fungicidas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Dez plantas de cada tratamento foram cortadas entre o quarto e quinto nó, e cada planta foi inoculada com auxílio de um canudo (fechado em uma das pontas) de 2,5 cm com a presença do micélio do fungo *S. sclerotiorum*.

Os escleródios do isolado 972B foram reativados em meio de cultura ágar-água, e após 5-7 dias foram repicados em meio de cultura BDA mais espesso que de costume para facilitar a retirada do micélio com o canudo. No oitavo dia após a inoculação, foi avaliado a interação com base na difusão da doença pelo ramo. As notas foram atribuídas de acordo com a especificação na Tabela 1.

Análise estatística

Os dados foram analisados usando o comando PROC GLIMMIX do programa estatístico SAS v. 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2014).

Para o experimento I os dados da AACPD e produtividade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito de cultivares, lâminas d'água e fungicidas e as possíveis interações entre estes fatores.

Para o experimento II, os dados da AACPD e as avaliações realizadas pelo *straw test* foram submetidos à ANOVA para avaliar o efeito dos fatores fungicidas e dias da pulverização, assim como a interação entre estes dois fatores. Para avaliar o período em que os tratamentos permaneciam com atividade residual do fungicida, aplicou-se o teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$) e a comparação dos dados foi realizada pela média da área lesionada da testemunha em relação à média dos demais tratamentos. As avaliações (24, 36 e 48 horas) da área lesionada foram correlacionadas com os dados da AACPD por regressão linear. Além disso, no DLA, os dados da porcentagem de controle dos fungicidas fluazinam e procimidona foram submetidos à análise de co-variância (ANCOVA) usando o comando PROC REG do programa estatístico SAS v. 9.4.

Para o experimento III, aplicou-se o teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$) para comparar cada tratamento em que foi aplicado o fungicida com o tratamento testemunha, e considerou-se que o ingrediente ativo não tinha efeito sobre a *S. sclerotiorum* quando o tratamento com aplicação do ingrediente ativo não diferia ($\alpha = 0,05$) mais do tratamento testemunha.

Para auxiliar na visualização dos dados, gráficos foram confeccionados utilizando-se o software Sigma Plot 10.0 (2008) com a porcentagem de controle dos tratamentos em relação à testemunha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I

Os valores de AACPD foram calculados pela avaliação da área lesionada em cm² com 24, 30, 36, 42 e 48 horas após a inoculação do fungo em folhas coletadas aos 13 dias após a primeira pulverização e aos 4 dias após a segunda pulverização. O efeito dos fatores ‘cultivares’ e ‘lâminas d’água’ sobre AACPD de *S. sclerotiorum* em folhas de feijoeiro não foram significativos, assim como todas as possíveis interações entre eles (Tabela 2). A tendência é que a eficiência do fungicida diminua com o aumento da lâmina d’água, sobretudo acima de 8 mm (VIEIRA; SUMNER, 1999), porém nesse experimento não foi constatado efeito das diferentes lâminas d’água sobre a atividade residual dos fungicidas.

Apenas o fator ‘fungicidas’ foi significativo ($\alpha = 0,01$) sobre a AACPD para folhas coletadas aos 13 dias após a primeira pulverização e aos 4 dias após a segunda pulverização. Já para a produtividade (g/vaso), somente os fatores ‘cultivares’ e ‘fungicidas’ foram significativos ($\alpha = 0,01$) (Tabela 2).

Para a coleta de folhas aos 13 dias após a primeira pulverização, nota-se que os fungicidas tiofanato metílico e procimidona não diferiram significativamente da testemunha ($\alpha=0,05$), diferentemente do fungicida fluazinam que diferiu da testemunha, sugerindo que este ingrediente ativo ainda apresenta atividade residual nas folhas de feijoeiro para o controle do fungo *S. sclerotiorum* (Figura 1). Resultados satisfatórios quanto à aplicação do fungicida fluazinam também foram observados no feijoeiro quando aplicado na água de irrigação sobre o solo, provavelmente por inibir a formação de apotécios (VIEIRA et al., 2001).

No experimento em que foram coletadas folhas aos 4 dias após a segunda pulverização foi constatado que apenas o fungicida tiofanato metílico não diferiu

da testemunha, sugerindo que a atividade residual desse fungicida era baixo ou ausente no 4º dia após a segunda pulverização (Figura 1). Também, pode-se observar que tanto o fungicida fluazinam quanto o procimidona diferiram da testemunha, sugerindo que a atividade residual desses dois fungicidas ainda estava ativo aos 4 dias após a segunda pulverização (Figura 1).

O experimento foi inoculado com micélio do fungo *S. sclerotiorum*, e a produtividade da cultivar IPR-Tangará foi aproximadamente 45% maior que a cultivar IAC-Alvorada, sugerindo que a cultivar de feijoeiro IPR-Tangará mostra tolerância ao patógeno (Tabela 3).

A aplicação dos fungicidas fluazinam, procimidona e tiofanato metílico resultou pelo menos no dobro de produtividade quando comparado à testemunha (Figura 2). A aplicação de fluazinam e benomyl em água de irrigação foram eficientes no controle do mofo-branco, porém o maior rendimento foi alcançado com o fluazinam aplicado com pulverizador costal, mas este não diferiu dos tratamentos fluazinam e benomyl aplicados com lâmina d'água de 3,5 mm (VIEIRA et al., 2001).

Experimento II

Tanto para o fator fungicida quanto para dias após a pulverização houve significância ($\alpha = 0,01$). Já a interação entre estes fatores não foi significativa para as duas metodologias (Tabela 4). O tratamento testemunha versus todos os tratamentos também foi significativo para as duas metodologias, com média da AACPD da testemunha (253,32) maior que a média de todos os tratamentos (112,71) no DLA e, no ST, a média do tratamento testemunha foi maior (7,89) quando comparado com a média de todos os tratamentos (5,10).

As médias da AACPD calculadas pelas áreas lesionadas de folhas tratadas com o fluazinam versus procimidona foram diferentes significativamente no DLA, com média do fungicida fluazinam maior ($\bar{x} = 161,28$) que o procimidona ($\bar{x} = 64,14$; $\alpha = 0,01$). O mesmo ocorreu com as médias das notas atribuídas no ST, em que para plantas tratadas com fluazinam ($\bar{x} = 5,58$) foram significativamente maiores que no fungicida procimidona ($\bar{x} = 4,62$; $\alpha = 0,01$).

Apesar do DLA apresentar um coeficiente de variação (CV) maior (58,2%) que o *straw test* (35,9%), o primeiro seria mais adequado para condução de experimentos a campo. Alguns motivos do DLA se adequar melhor para experimentos à campo são: I) o DLA é mais rápido de ser conduzido, pois enquanto o DLA dura aproximadamente 48 horas após a inoculação do fungo, o ST precisa de 8 dias para avaliação após a inoculação; II) o ST é um teste destrutivo, pois a planta é cortada entre o 4º e 5º nó e o fungo vai se desenvolver nos ramos, levando a planta a morte, enquanto para o DLA é necessário a retirada de apenas uma folha da planta do feijoeiro; III) o DLA é conduzido em laboratório, ou seja, em ambiente controlado, enquanto o ST teria que ser inoculado à campo e no caso de chuvas ou ventos, a inoculação poderia ser perdida; IV) o DLA é uma avaliação mais objetiva, pois é calculado pela área lesionada em cm^2 através do program Image J e o ST é uma avaliação mais subjetiva, conforme também observado por Otto-Hanson et al. (2011).

O DLA tem sido utilizado em experimentos para estudos de resistência da *S. sclerotiorum* para soja (KIM et al., 2000; KULL et al., 2004) e em feijão e soja (KULL et al., 2003). O *straw test* tem sido utilizado em vários projetos para fazer o *screening* de diferentes isolados de mofo-branco para estudo de agressividade dos isolados e também inoculando em diferentes cultivares de feijoeiro, visando localizar cultivares resistentes/suscetíveis ao patógeno (OTTO-HANSON et al., 2011).

Os dados avaliados com 24, 36, 48 horas após a inoculação foram correlacionados com uma regressão linear com AACPD (R^2 de 94, 98 e 96%), respectivamente (Tabela 5). Por padronização dos trabalhos futuros, as lesões nas folhas serão avaliadas apenas 48 horas após a inoculação do fungo *S. sclerotiorum*, pois além do R^2 ser alto, a área lesionada será maior nessa avaliação.

A partir dos nove e oito dias após a pulverização, o tratamento testemunha não diferiu significativamente ($\alpha = 0,05$) dos tratamentos com aplicação de fluazinam para o DLA e para o ST, respectivamente. Isso sugere que o fungicida fluazinam estava com atividade residual baixa ou ausente nesse período. Já para o fungicida procimidona, todos os tratamentos ainda diferiam da testemunha após 15 dias da pulverização para o DLA, mas a testemunha não diferiu mais significativamente ($\alpha = 0,05$) a partir dos 13 dias após a pulverização para o ST.

No decorrer dos dias foi visível o decréscimo da porcentagem de controle nos tratamentos aplicados com o fluazinam pelo DLA. O mesmo padrão foi constatado pela aplicação do fungicida procimidona, mas em menor intensidade. As taxas de decréscimo do controle da doença (regressão linear) avaliadas pelo DLA foram calculadas para cada tratamento e mostrou que o fungicida fluazinam diminui mais rapidamente a atividade residual do ingrediente ativo (Figura 3).

Aos 4 DAP, a porcentagem de controle para os dois fungicidas foi de aproximadamente 90%, mas aos 14 DAP, a porcentagem de controle foi de aproximadamente 12 e 46% para fluazinam e procimidona, respectivamente, o que demonstra uma maior atividade residual do procimidona em relação ao fluazinam.

Experimento III

A média da área foliar lesionada (cm²) foi avaliada para cada tratamento e no decorrer dos dias, com a primeira coleta um dia após a pulverização e outras a cada dois dias até a última coleta, aos nove dias após a pulverização (Tabela 6).

Um dia após a pulverização, apenas o fungicida do grupo das estrobilurinas, a piraclostrobina, e clorotalonil não diferiram significativamente da testemunha pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$). Mas no 3° e 5° DAP, o fungicida piraclostrobina diferiu da testemunha, o que pode ser explicado pelo fato de o produto não ter sido completamente absorvido no primeiro DAP, mas com plena absorção depois desse dia. No 7° DAP o produto voltou a não diferir mais da testemunha, sugerindo que a atividade residual desse fungicida sobre o mofo-branco estava ausente ou muito baixo (Tabela 6).

O outro produto com estrobilurina em sua constituição (piraclostrobina + metconazol) não apresentava mais efeito sobre o mofo-branco aos 3 DAP, pois este tratamento não diferia mais da testemunha nessa data, o que demonstra ausência ou baixo residual do ingrediente ativo.

A atividade fungicidas dos inibidores do quinol (QoI) resulta da inibição da respiração mitocondrial dos fungos, impedindo a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c do complexo III (citocromo bc1 – ubiquinol oxidase no sítio Q₀) e pelo seu amplo espectro de atividade, a estrobilurina tem sido muito utilizada na agricultura (BARTLETT et al., 2002). Os fungicidas QoI são efetivos na inibição da esporulação, germinação de esporo e crescimento micelial do patógeno (LIANG et al., 2015).

O clorothalonil é um fungicida protetor que faz parte do grupo químico Nitrilas e atua alterando a permeabilidade da membrana fúngica, em reação

irreversível com compostos contendo grupamento tióis e aminocelulares. O mecanismo de ação é atribuído a inativação de enzimas sulfidrilas (VINCENT; SISLER 1968; SHERRARD et al. 2003). A conjugação com sulfidrilas (particularmente glutatona) na germinação de células fúngicas conduz à interrupção da glicólise, pois o fungicida evita a ativação da enzima gliceroaldeído-3-fosfato de hidrogenase e, provavelmente, de outras enzimas similares, com conseqüente falta de energia. Ao serem desativadas, estas enzimas não podem completar sua ação no ciclo de Krebs e o ATP não será produzido. Assim, as células fúngicas não completam processos essenciais para sua formação e viabilidade, com posterior morte.

O triazol tetraconazol também não apresenta mais atividade residual do produto no 3º DAP. No 9º DAP, este tratamento diferiu da testemunha, mas a área lesionada já era maior que a área lesionada na testemunha, ou seja, o fungo inoculado desenvolveu mais no tratamento com tetraconazol que no tratamento testemunha. Os triazóis promovem a inativação do processo de demetilação do lanosterol até compostos intermediários, precursores do ergosterol. A ausência do ergosterol e o aumento de compostos intermediários promovem uma desorganização da estrutura celular, induzindo a formação de membrans alternativas. Com doses elevadas de fungicida, observa-se dano direto sobre a membrana, assim como alterações morfológicas. Essas alterações caracterizam-se por inchamento das células, vacuolização excessiva, septação incompleta, aparecimento de vesículas entre a membrana e a parede celular e a formação de inclusões membranosas (FORCELINI, 1994; TOMLIN, 2002).

A maior dose do produto comercial hidróxido de fentina (1 L ha^{-1}) não apresentava mais atividade residual sobre o mofo-branco no 5º DAP, mas a menor dose desse mesmo produto ($0,4 \text{ L ha}^{-1}$) não tinha mais atividade no 3º DAP. Para o produto

comercial de hidróxido de fentina, o recomendado é aplicar no máximo $0,4 \text{ L ha}^{-1}$, pois no caso do uso de doses maiores pode ocorrer fitotoxicidade, conforme descrição da bula do produto comercial, bem como observado no campo neste experimento.

O hidróxido de fentina faz parte do grupo dos fungicidas orgânicos à base de estanho (organoestânico), e são fungicidas de longo período residual. Inibidores multi-sítio, previnem a germinação de esporos e inibem o metabolismo de fungos, particularmente a respiração, inibem a fosforilação oxidativa na mitocôndria e induzem a peroxidação de lipídios. Baixas concentrações de compostos organoestânicos inibem a translocação de H^+ ligados a membrana, de H^+ ATPase e de íons como Na^+ e K^+ (PAPA et al., 1982; POWERS; BEAVIS, 1991).

Dos fungicidas utilizados nesse experimento, procimidona e fluazinam são os únicos registrados para controle do mofo-branco. O ingrediente ativo procimidona foi o único que ainda apresentava atividade residual no 9º DAP, e a porcentagem de controle do patógeno ficou em torno de 95% até os 7 DAP, caindo para 75% aos 9 DAP. É um fungicida que apresenta bom controle do patógeno até aos 9 DAP. O fungicida fluazinam não diferiu mais da testemunha aos 9 DAP, mas a porcentagem de controle do fungo foi de 86, 83, 59, 53, 5% com 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a pulverização (Figura 4).

Já os produtos não registrados para o mofo-branco apresentavam controle menor que 45% já no 3º DAP, sendo que o tetraconazol e clorotalonil não apresentaram controle (0%).

CONCLUSÕES

- O DLA é um método mais adequado para avaliar a atividade residual de fungicidas aplicados no campo quando comparado ao *straw test*;

- O DLA é um método prático e rápido para avaliar a eficiência de controle de produtos não-registrados ou novos ingredientes ativos sobre o mofo-branco;
- Os fungicidas fluazinam e procimidona diferem quanto ao seu período residual na cultura do feijoeiro;
- As cultivares de feijoeiro IAC-Alvorada e IPR-Tangará respondem diferentemente ao ataque do fungo *S. sclerotiorum*;
- A produtividade é influenciada de maneira positiva pela aplicação de fungicidas no feijoeiro, com duas aplicações, sendo a primeira com 50% de florescimento e a segunda 15 dias após.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à Arysta LifeScience do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abawi, G. S.; Polach, F. J.; Molin, W. T. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 65, p. 673-678, 1975.
2. Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 5 de out. 2015. BARDIN, S. D., HUANG, H. C. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23 p. 88-98, 2001.
3. BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa. v. 23, p. 88-98. 2001.
4. Bartlett, D. W.; Clough, J. M.; Godwin, J. R.; Hall, A.; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**. v. 58, p. 649-662, 2002.
5. Brasil. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 31 de ago. 2015.
6. Butzler, T. M.; Bailey, J. E.; Beute, M. K. Integrated management of Sclerotinia blight in peanut: Utilizing canopy morphology, mechanical pruning, and fungicide timing. **Plant Disease**, v. 82, p. 1312-1318, 1998.

7. Chen, L.; Li, X.; Wang, Z.; Pan, C.; Jin, R. Residues dynamics of procymidone in leeks and soil in greenhouses by smoke generator application. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 73, p. 73-77, 2010
8. Companhia Nacional De Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 2 – safra 2014/15, n. 8 – oitavo levantamento, mai. 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: jun. 2015.
9. Forcelini, C. A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I. triazoles. **RAPP**, v. 2, 1994. p. 335-355.
10. Hartman, G. L.; Sinclair, J. B.; Rupe, J. C. **Compendium of soybean diseases**. 4th ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1999. 128p.
11. Guo, Z.; Miyoshi, H.; Komyoji, T.; Haga, T.; Fujita, T. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chlo-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1056, p. 89-92, 1991.
12. Kim, H. S., Hartman, G. L., Manandhar, J. B., Graef, G. L., Steadman, J. R., Diers, B. W. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. **Crop Science**, v. 40, p. 665-669, 2000.
13. Kull, L. S.; Vuong, T. D.; Powers, K.S.; Eskridge, K.M.; Steadman, J.S.; Hartman, G.L. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, v. 87, p. 1471-1476, 2003.
14. Kull, L. S.; Pedersen, W. L.; Palmquist, D.; Hartman, G. L. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. v. 88, p. 325-332, 2004.
15. Lehner, M. S.; Paula Júnior, T. J.; Silva, R. A.; Vieira, R. F., Carneiro, J. E. S.; Schnabel, G.; Mizubuti, E. S. G. Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: a thorough assessment using discriminatory dose, EC50, high-resolution meting analysis, and description of new point mutation associated with thiophanate-methyl resistance. **Plant Disease**, v.99, n.11, p. 1537-1543, 2015.
16. Lemay, A. V.; Bailey, J. E.; Shew, B. B. Resistance of peanut to *Sclerotinia* blight and the effect of acibenzolar-S-methyl and fluazinam on disease incidence. **Plant Disease**, v. 86, p. 1315-1317, 2002.
17. Liang, H.-J.; Di, Y.-L.; Li, J.-L.; You, H.; Zhu, F.-X. Baseline sensitivity of pyraclostrobin and toxicity of SHAM to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 99, p. 267-273, 2015.
18. Li, Y.; Kim, M. R.; Lee, K. B.; Kim, I. S.; Shim, J. H. Determination of procymidone residues in ginseng by GC-ECD and GC-MS equipped with a solvent-free solid injector. **Food Control**. v. 18, p. 364-368, 2007.
19. Mahoney, K. J.; McCreary, C. M.; Gillard, C. L. Response of dry bean white mould [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causal organism] to fungicides. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, p. 905-910, 2014.

20. Matherom, M. E.; Porchas, M. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. **Plant Disease**, v. 88, p. 665-668, 2004.
21. Ma, Z., Michailides, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, p. 853-863, 2005.
22. Mueller, D. S.; Dorrance, A. E.; Derksen, R. C.; Ozkan, E.; Kurle, J. E.; Grau, C. R.; Gaska, J. M.; Hartman, G. L.; Bradley, C. A.; Pedersen, W. L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of sclerotinia stem rot on soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 1, p. 26-31, 2002.
23. Otto-Hanson, L.; Steadman, J. R.; Higgins, R.; Eskridge, K. M. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. **Plant Disease**, v. 95, p. 1370-1376, 2011.
24. Papa, S.; Guerrieri, F.; Gomez-Puyou, M. T.; Barranco, J.; Gomez-Puyou, A. Studies of the mechanism of action of triphenyltin on proton conduction by the H⁺ ATPase of mitochondria. **European Journal of Biochemical**, v. 128, p.1-7, 1982.
25. Petzoldt, R.; Dickson, M. H. Straw test for resistance to white mold in beans. Ann. Rep. **Bean Improvement Cooperation**, v.39, p.142-143, 1996.
26. Powers, M. F.; Beavis, A. D. Triorganotins inhibit the mitochondrial inner membrane anion channel. **Journal of Biological Chemical**, v. 266, n. 26, p. 17250-17256, 1991.
27. SAS Institute. SAS/STAT Software: Changes and Enhancements Through Release 9.4. SAS, Cary NC. 2014.
28. Shaner, G.; Finney, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.
29. Sherrard, R. M.; Murray-Gulde, C. L.; Rodgers, J. H.; Shah, Y. T. Comparative toxicity of chlorothalonil: *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 56, n. 3, p. 327-333, 2003.
30. Sigmaplot. 2008. For windows, version 10.0. Systat Software, 2008.
31. Teran, H.; Lema, M.; Schwartz, H. F.; Duncan, R.; Gilbertson, R.; Singh, S. P. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **Annual Reporter Bean Improvement Cooperation**, v. 49, p. 115-116, 2006.
32. Tomlin, C. D. S. **The pesticide manual** – a world compendium. Surrey, UK: British Crop Protection Council. 11 ed., 1997. p. 1252-1254.
33. Vieira, R. F.; Sumner, D. R. Application of fungicides to foliage through overhead sprinkler irrigation – a review. **Pesticide Science**, v. 55, p. 412-422, 1999.

34. Vieira, R. F.; Paula Júnior, T. J. De; Peres, A. P.; Machado, J. da C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 770-773, 2001.
35. Vieira, R. F.; Paula Júnior, T. J.; Carneiro, J. E. S.; Teixeira, H.; Queiroz, T. F. N. Management of white mold in type III common bean with plant spacing and fungicide. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 2, p. 95-101, 2012.
36. Vincent, P. G.; Sisler, H. D. Mechanism of antifungal action of 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile. **Physiologia Plantarum**, v. 21, p. 1249-1264, 1968.
37. Vitoratos, A. G. Mode of action and genetic analysis of resistance to fluazinam in *Ustilago maydis*. **Journal of Phytopathology**. v. 162, p.737-746, 2014.

TABELAS

Tabela 1. Escala de notas para mofo-branco em feijão.

Notas	Descrição
1	Sem sinais de infecção quando retirar o canudo para inspeção.
2	Infecta o ramo, mas a invasão no 1º internódio é menor que 2,5 cm
3	A invasão no 1º internódio é maior que 2,5 cm, mas não alcança o 1º nó.
4	Invasão dos ramos alcança o 1º nó, mas não passa dele.
5	Invasão dos ramos passa o 1º nó, mas a difusão no 2º internódio é menor que 2,5 cm.
6	A invasão no 2º internódio ultrapassa os 2,5 cm, mas não atinge o 2º nó.
7	A invasão dos ramos atinge o 2º nó, mas não ultrapassa este.
8	A invasão dos ramos ultrapassa o 2º nó, mas a invasão no 3º internódio é menor que 2,5 cm.
9	A invasão nos ramos é maior que 2,5 cm no 3º internódio conduzindo à planta a morte.

(PETZOLDT; DICKSON, 1996, modificada por TERAN et al, 2006)

Tabela 2. Resumo da análise de variância (ANOVA) das cultivares, lâminas d'água, fungicidas e as possíveis interações entre estes fatores para a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), aos 13 dias após a primeira pulverização e aos 4 dias após a segunda pulverização, e para produtividade. Botucatu, 2013.

	13 dias após a 1ª pulverização	4 dias após a 2ª pulverização	Produtividade (g/vaso)
Cultivares	ns ¹	ns	**
Lâminas	ns	ns	ns
Fungicidas	**	**	**
Cultivares*Lâminas	ns	ns	ns
Cultivares*Produtos	ns	ns	ns
Lâminas*Produtos	ns	ns	ns
Cultivares*Lâminas*Produtos	ns	ns	ns

¹ns (não significativo), ** ($\alpha=0,01$)

Tabela 3. Produtividade (g vaso⁻¹) para as cultivares IAC-Alvorada e IPR-Tangará, após a inoculação do micélio de *S. sclerotiorum*. Botucatu, 2013.

Cultivares	Prod. (g vaso ⁻¹) ¹
IAC-Alvorada	10,77 B
IPR-Tangará	15,56 A

¹ Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 4. Médias da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) obtida pelo *Detached Leaf Assay*, notas atribuídas para o *Straw test* e ANOVA para o efeito dos fungicidas fluazinam e procimidona aplicados em diferentes dias em Pereiras, SP.

Dias após a pulverização (DAP)	<i>Detached leaf assay</i> (AACPD) ¹		<i>Straw test</i> (ST) ²	
	Fluazinam	Procimidona	Fluazinam	Procimidona
Testemunha	253,32		7,89	
15	204,45 ^{ns3}	51,72	7,44 ^{ns}	5,90 ^{ns}
14	241,38 ^{ns}	137,57	6,66 ^{ns}	6,66 ^{ns}
13	278,72 ^{ns}	138,15	7,10 ^{ns}	7,33 ^{ns}
12	224,12 ^{ns}	79,52	5,80 ^{ns}	5,20
11	202,32 ^{ns}	106,78	8,10 ^{ns}	4,80
10	158,14 ^{ns}	88,15	6,00 ^{ns}	5,11
9	194,18 ^{ns}	82,85	5,80 ^{ns}	4,20
8	128,49	37,69	6,10 ^{ns}	4,90
6	112,26	9,36	5,00	5,60 ^{ns}
5	116,66	3,19	3,20	2,90
4	23,28	22,39	2,70	1,50
3	51,35	12,32	3,10	1,33
Coef. de variação (%)	58,18%		35,88%	
R ²	0,69		0,53	
Testem. x tratamentos	** ⁴		**	
Fungicida	**		**	
DAP	**		**	
Fungicida*DAP	ns ⁴		ns	

¹AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença foi calculada depois das avaliações com 24, 36 e 48 após a inoculação do fungo *S. sclerotiorum*. ²Straw test = plantas foram inoculadas na casa-de-vegetação e avaliadas 8 dias após usando a “escala modificada de Modified Petzoldt and Dickson” (TERAN et al, 2006). ³ns = não significativo a diferença quando comparado o tratamento testemunha com os tratamentos com fungicidas pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$). ⁴** ($\alpha = 0,01$); ns (não significativo)

Tabela 5. Regressão linear e correlação entre as avaliações com 24, 36, 48 horas x AACPD.

Correlação	Regressão	R ² (%)
24 horas x AACPD	$y = 65,703x + 2,4658$	94,47
36 horas x AACPD	$y = 29,123x + 4,4183$	98,29
48 horas x AACPD	$y = 17,129x + 6,3128$	95,98

Tabela 6. Média da área foliar lesionada (cm²) de folhas coletadas no 1º, 3º, 5º, 7º e 9º dia após a pulverização dos diferentes ingredientes ativos. Pereiras, 2014.

Tratamentos	Dose p.c. (kg ou L ha ⁻¹)	1 DAP ¹	3 DAP	5 DAP	7 DAP	9 DAP
Testemunha	-	10,68	8,57	8,19	8,58	6,35
Fluazinam	1,5	1,50	1,43	3,35	4,02	6,02 ^{ns}
Procimidona	1,5	2,18	0,21	0,40	0,41	1,57
Hid. Fent.	0,4	3,32	5,88 ^{ns}	6,96 ^{ns}	7,76 ^{ns}	8,02 ^{ns}
Hid. Fent.	1,0	3,62	5,39	6,44 ^{ns}	7,43 ^{ns}	7,56 ^{ns}
Piraclostrobina	0,3	10,20 ^{ns}	4,83	5,05	6,33 ^{ns}	7,16 ^{ns}
Tetraconazol	0,8	2,10	8,96 ^{ns}	8,87 ^{ns}	7,59 ^{ns}	8,61
Clorotalonil	2,5	9,71 ^{ns}	9,61 ^{ns}	8,25 ^{ns}	7,53 ^{ns}	8,05 ^{ns}
Piraclostrobina + Metconazol	0,5	2,39	6,05 ^{ns}	5,78 ^{ns}	7,27 ^{ns}	7,59 ^{ns}

ns = tratamentos com fungicidas não diferem significativamente da testemunha pelo teste de Dunnett ($\alpha=0,05$). ¹DAP = dias após a pulverização.

FIGURAS

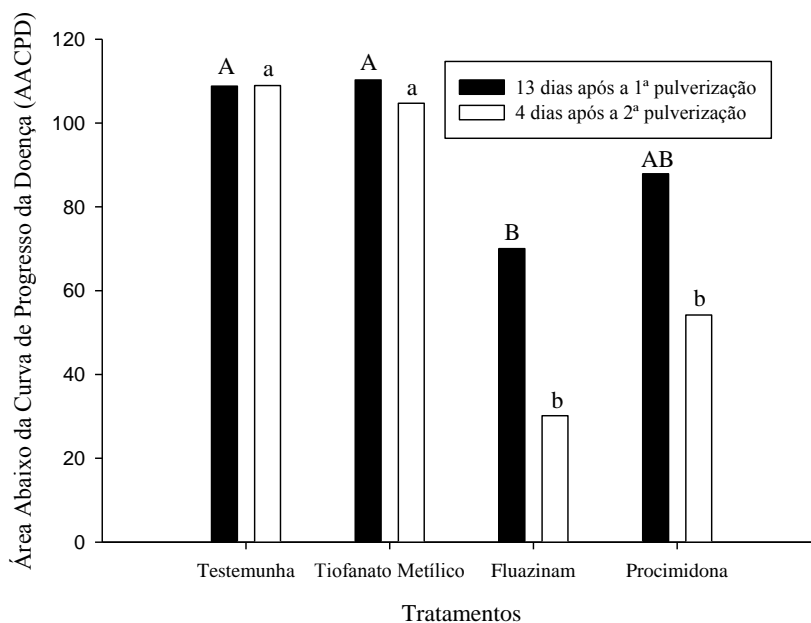


Figura 1. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) obtida com *Detached leaf assay* para o fator fungicidas, com 24, 30, 36, 42 e 48 horas após a inoculação do fungo *S. sclerotiorum* em folhas coletadas 13 dias após a primeira pulverização e 4 dias após a segunda pulverização. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) para folhas coletadas 13 dias após a primeira pulverização e letras minúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) para folhas coletadas 4 dias após a segunda pulverização.

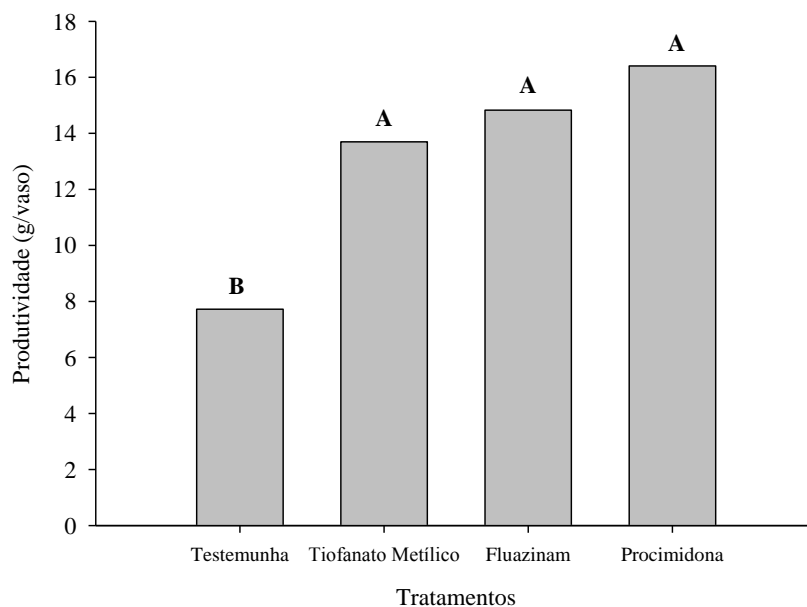


Figura 2. Produtividade de feijoeiro (g vase^{-1}) para o fator fungicidas. Letras distintas indicam diferença significativa à 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey

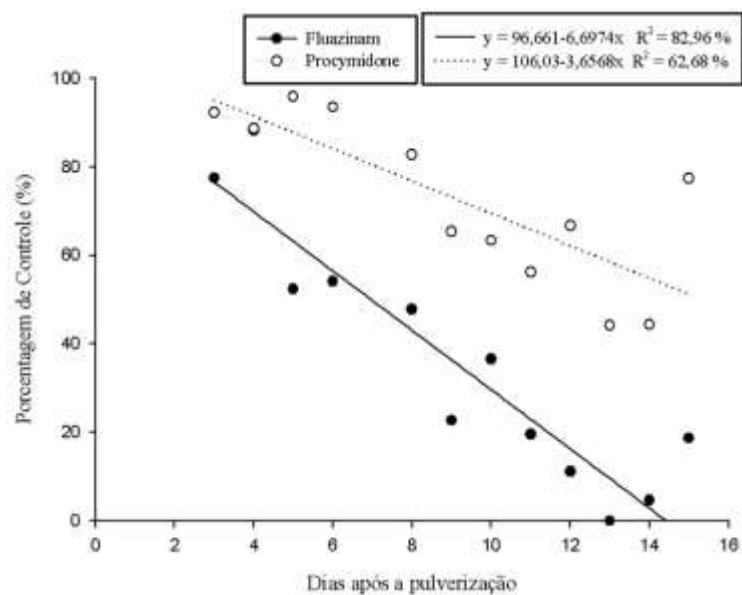


Figura 3. Controle do mofo-branco (%) pelos fungicidas fluazinam e procimidona no decorrer dos dias após a pulverização pelo DLA.

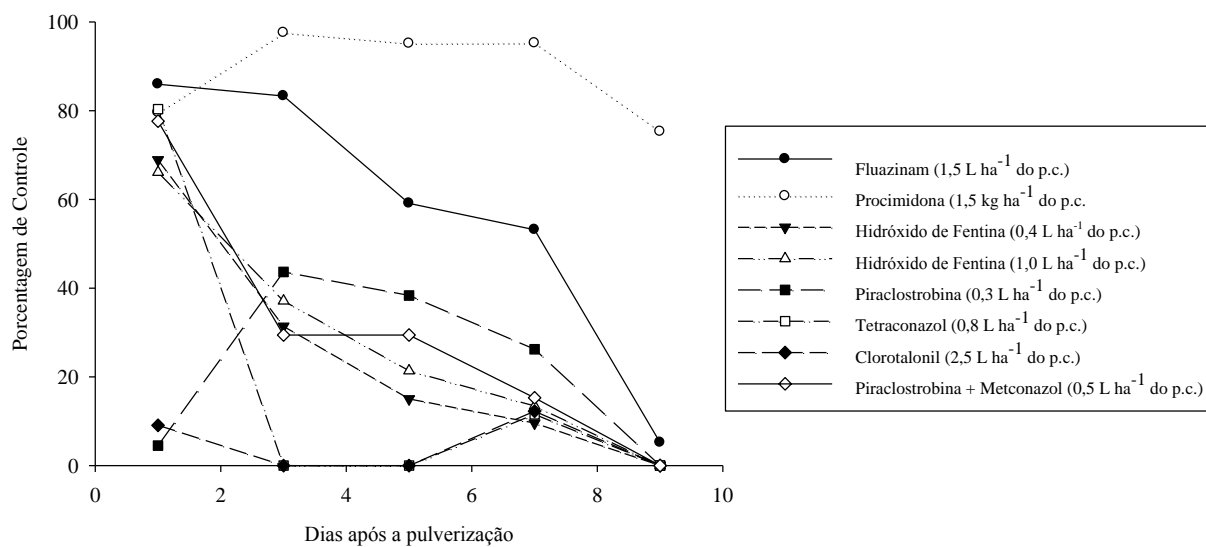


Figura 4. Controle do mofo-branco (%) para os diferentes ingredientes ativos após pulverização no feijoeiro.

Research Article**Capítulo II “APPLICATION METHODS AND FUNGICIDES RESIDUES
EVALUATION APPLIED FOR WHITE OLD CONTROL IN SOYBEAN”**

Thomas J. J. Miorini¹, Carlos G. Raetano¹, Rafael Werle¹, Ângelo Stavieski¹

1) Department of Plant Protection, São Paulo State, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP 18.610-307, Brazil

Corresponding author: Carlos G. Raetano, raetano@fca.unesp.br

Miorini, T. J. J., Raetano, C. G., Werle, R., and Stavieski, A. 201X. Residual activity of fungicides applied for white mold control in soybean by detached leaf test and chromatography. *Trop. Plant Pathol.* XX:XXX-XXX.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is a necrotrophic fungal pathogen that infects more than 400 species of plants, like soybean (*Glycines max*). One method of disease control is well-timed fungicide applications. Fungicides such as fluazinam, procymidone and carbendazin are currently available in Brazil to manage *S. sclerotiorum* in soybean. To investigate the residual activity of fungicides on soybean two methods were used: Quenchers method for assessing of the fungicide concentration and detached leaf assay (DLA). For this, different fungicide application techniques were used. It was observed with DLA that fungicides have different effects on its residual period, which fluazinam decreased more quickly the fungicidal residues activity than procymidone, and higher water levels decreased more quickly the residual effect of the active ingredient. The use of mineral oil did not influence the increase of the residual period of fungicides after the first application; however, after second application it was only significant for procymidone. For Quencher method, the

rates of decrease in the concentration showed that the concentration decreases more quickly in fluazinam fungicide, followed by procymidone and carbendazim.

Key-words: *Sclerotinia stem rot*, *Glycine max*, chemigation, oil mineral, detached leaf assay, chromatography

INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* L.) is a major summer crop in Brazil, with second largest production area in the world, behind the United States. In the 2013/2014 season, soybean production area was 30.17 million hectares and in the 2014/2015 season, 31.57 million hectares were sown. Expected production in the 2014/2015 season is more than 95 million tons, representing an increase of 10.4% compared to the previous season (CONAB, 2015).

Sclerotinia stem rot, caused by *Sclerotinia sclerotinorum* (Lib.) de Bary, is major focus for soybean farmers and researchers in countries such as Brazil (Lobo Junior and Abreu 2000) and the north-central of United States (Mueller et al. 1999). White mold incidence in soybean increased considerably from 2008, where 2013/2014 season was estimated that about 22.5%, or 6.8 million hectares of soybean planted area in Brazil were infested by *S. sclerotiorum* (Meyer et al. 2014b, Meyer et al. 2015.). Chemical control is a major control measure and should be used with integrated disease management (Meyer et al. 2014a). *S. sclerotiorum* is widespread within Brazil, with a large spread in the South, center-West, and some areas of the Northeast of the country (Juliatti et al. 2013).

Control of *S. sclerotiorum* is particularly challenging because it causes disease on over 400 species of plants worldwide including important crops, as soybean, common bean, cotton and potato (Boland and Hall 1994, Bolton et al. 2006). In addition, *S. sclerotiorum* is able to survive in the soil as sclerotia for many years. Sclerotia are able to germinate asexually in the soil or reproduce sexually, producing an apothecium capable of

releasing wind-blown ascospores that colonize flowers, leading to secondary infection of leaves, petioles and stems through direct contact with infected flowers (Abawi et al. 1975).

Fungicide application for *Sclerotinia* stem rot in soybean is typically made either via ground application, however chemigation can be used. Aircraft application results in higher initial residue levels because there is no dilution effect as compared to application by irrigation (Hamm and Clough 1999). Large volumes of irrigation water are used during chemigation, approximately 25,000 to 58,400 L ha⁻¹ as compared to 47 L ha⁻¹ for aerial application (Bruhn and Fry 1982; Hamm and Clough 1999). Nevertheless, chemigation has increased in the last years, primarily due to lower application cost as compared to aircraft application (Johnson et al. 2000). Chemigation has been shown to be an effective method of disease control for rust in dry bean (Pinto and Costa 1999), angular leaf spot and alternaria spot in dry bean (Cunha et al. 2001), and early blight in tomato (Tolentino Jr. et al. 2011).

Application of pesticides with adjuvants may change as the surface tension characteristics (Mendonça et al. 2007), which promote spread and penetration of liquid solutions on plant cuticle, prolonging residual activity of fungicides. Adjuvants may improve disease management and allow reduced fungicide levels, however knowledge on adjuvants and their role in disease management is deficient (Gent et al. 2003).

A major limitation to previous studies is that none characterized residual fungicide activity for disease control, which is important for recommendations regarding application frequency. Indeed, this type of agrochemical residue analysis has been performed previously, typically using analytical methods such as gas chromatography and high performance liquid chromatography. Chemigation results in lower fungicide residues on the foliage immediately after application when compared with sprayer (Costa et al. 1994).

In addition, the difference between application methods is not proportional to the volume of water used and tends to decrease over time (Cunha and Nascimento 2013).

Analytical techniques for fungicide residue analysis generally require a high degree of expertise for critical steps such as liquid–liquid solvent extraction and series of cleanup procedures for sample preparation (Li et al. 2007). In addition to cost limitations, this type of fungicide residue analysis does not provide practical information about disease suppressive activity. QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) is a technique involves microscale extraction using acetonitrile and purifying the extract using dispersive solid-phase extraction (Wilkowka and Biziuk 2011).

A simpler and more informative approach would be use of a detached leaf assay. In this method, plants are treated with fungicides and leaves are harvested and inoculated with the pathogen under environmental controlled conditions, allowing quantification of necrotic lesion formation (Mueller et al. 2002). This method has been used to compare fungicide treatments, but none have used this method to assess residual fungicidal activity over time or under field conditions.

The primary objective of our study was to apply the detached leaf assay (DLA) as a measure of disease suppression ability of fungicides for two experiments: I) application of fluazinam and procymidone by chemigation and II) conventional application by sprayer (fluazinam, procymidone and carbendazim) associated with adjuvants. Secondary objectives were to apply fungicides in conventional manner (sprayer) in field, collecting leaves to analyze the concentration (mg kg^{-1}) of three ingredient active (fluazinam, procymidone and carbendazim) by chromatography method (QuEChERS methodology).

MATERIAL AND METHODS

Chemigation experiment

Field experiments were conducted using the soybean cultivar 'NA-5909R'. Chemigation was performed at the Agricultural Research and Development Center (CPDA) at Arysta LifeScience in Pereiras, SP, Brazil. Experimental design was randomized blocks with the treatments distributed in factorial scheme 2 x 4 +1 (two fungicides: fluazinam and procymidone with four irrigation levels plus control treatment without fungicide application and no additional irrigation) with four repetitions. Fungicides were applied at the maximum dose recommended for each commercial product, using 1.0 L ha⁻¹ and 2.0 kg ha⁻¹ of commercial product for fluazinam and procymidone, respectively. Two fungicide applications were made, beginning at 50% full bloom (3.0, 7.0, 11.0 and 15.0 mm) and the second application at 14 days thereafter with 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mm of water level. Plots were irrigated using a Naandan 435 ½' sprinklers, which were limited to move in an area of 90° (¼ circle) and with a radius of 6 m, totaling approximately 28.25 m² of each plot. Sprinklers were connected by ½' hoses to a tank of 2,000 L. The hose was connected to the tractor's power tie-off set to 540 rpm with pressure gauge of 3 bars. For each treatment, the commercial product and water were added to the tank in the amount needed to make four applications. Twelve leaves were collected after fungicide treatment and every two days thereafter over 12 days post first application and 13 days post second application. For procymidone treatments, leaves were also collected in 15th and 17th day after second application. Leaves were taken to laboratory to carry out detached leaf assay.

Conventional Applications with Mineral Oil

Conventional application (sprayer) with mineral oil were made under field conditions at CPDA using soybean cultivar 'NA-5909R'. Experimental design used

randomized blocks with the treatments distributed in a factorial scheme $3 \times 2 + 1$ (three fungicides: fluazinam, procymidone and carbendazin associated or no with mineral oil aliphatic hydrocarbons (0.5% v/v) plus control treatment without fungicide application) with four repetitions. Fungicide applications were conducted using 1.0 (L) kg ha⁻¹ of commercial product for fluazinam, procymidone and carbendazin. Two fungicide application were made, beginning at 50% full bloom and the second application 16 d. thereafter and plots were 20 m². Conventional application was made using a knapsack sprayer pressurized with CO₂ equipped with spray boom of 2.5 m and single flat fan nozzles (TeeJet XR 11004, Spraying Systems Co., Glendale Heights, IL). The nozzles were spaced of 0.5 m and the rate application was 500 L ha⁻¹. Twelve leaves were collected at 3rd, 5th, 7th, 9th and 11th day after first application and 1st, 4th, 6th, 8th, 10th, 12th, 14th, 16th, 19th, and 23rd day after second application. Leaves were taken to laboratory to perform the detached leaf assay.

Detached leaf assay

The youngest fully expanded trifoliolate leaves were collected and immediately transported to the laboratory. To test the residual fungicidal activity, it was used the detached leaf assay, similar to methods used previously with *S. sclerotiorum* resistance studies in soybean (Kim et al. 2000; Kull et al. 2004). Petioles were pushed through the test tube (12 x 75 mm) with tap water and a bung lid on top with a central hole to allow the entrance of the leaf petiole. Four paper towels were placed in the bottom of each aluminum pan "D100" (515 mm x 355 mm x 73 mm). Four glass Petri dishes (100 x 15 mm) were placed upside down in each aluminum pan on paper towels to serve as platforms for each trifoliolate. Four trifoliolates were placed in an aluminum pan with the middle leaf over

each glass Petri dish. Experimental design in the laboratory was a partially-balanced incomplete block design.

Inoculations were performed to simulate natural infection resulting from direct contact infection, using *S. sclerotiorum* mycelium. The isolate used for inoculations was originally collected from soybean at Luiz Eduardo Magalhães/Bahia (973 D) in 2012. For inoculations, an actively growing culture was transferred to potato dextrose agar (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA) and after 48 hours, a 6 mm diameter plug was placed onto each middle trifoliolate leaf with mycelia in contact with the leaf. After inoculations, 300 mL of water was added to each aluminum pan and to maintain humidity, enclosed with stretchable PVC film 450 mm wide (Alpes – Indústria e Comércio de Plásticos Ltda., São Paulo, SP). Moist chambers were maintained at ambient room temperature (25 ± 2 °C) and after 48 hours, evaluations were performed. To estimate necrotic lesion area, a digital image of each leaf was analyzed with software Image J (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Actual size of each lesion was estimated by including a grid of known size (1 cm) in each photo.

Conventional Application for Chromatography analysis

Fungicide applications by sprayer were made under field conditions at CPDA using soybean cultivar '*BMX Potência RR*'. Applications were made in band of 80 m for each treatment, with the fungicides fluazinam, procymidone and carbendazin plus control treatment without fungicide application. Fungicide applications were carried out using 1.0 L (kg) ha⁻¹ commercial product for fluazinam, procymidone and carbendazim. Conventional application was made using a knapsack sprayer pressurized with CO₂ equipped with spray boom of 2.5 m and single flat fan nozzles (TeeJet XR 11004, Spraying Systems Co., Glendale Heights, IL). The nozzles were spaced of 0.5 m and the rate

application was 500 L ha⁻¹. After fungicide application, approximately 300 leaves were collected at 0, 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th, 12th, and 14th day after each fungicide application. In each evaluation, leaves were collected in area equivalent to 25 m² (2.5 x 10 m) of a total 200 m² (2.5 x 80 m).

Chromatography methodology

Leaves were collected from the field, placed in plastic bags, labeled and stored at -20 °C. When all samples were collected in the field and were sent in cooler to Bioagri a Mérieux NutriSciences Company, Piracicaba, SP, Brazil. A total of 25 samples were submitted for analysis of the concentration of each product (3 active ingredients in 8 leaf collections, plus control). For the control treatment, the collection was about 500 leaves and this collection was only held on the 14th day after fungicide application in an area without fungicide application used as control.

Extraction and partitioning were carried out according to a modified version of the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) method, as previously described (Anastassiades et al. 2007, Payá et al. 2007). This technique involves microscale extraction using acetonitrile and purifying the extract using dispersive solid-phase extraction. Samples were spiked while frozen with a small volume of an appropriate standard mixture solution. Approximately 25 ± 0.1 g of frozen leaf sample was weighed in an Erlenmeyer flask. A total of 42.5 mL of ultrapure water into each flask and the result of this mixture was weighed 13.5 g in a 50 ml polypropylene centrifuge tube (this weight equals 5 g of the sample). The main extraction involved the addition of 10 mL of acetonitrile and the tube was closed and shaken vigorously by hand for 1 min. To induce phase separation and pesticide partitioning, a buffer-salt mixture (consisting of 8 parts magnesium sulfate, 2 parts sodium chloride, 1 part disodium hydrogen citrate

sesquihydrate, and 2 parts trisodium citrate dihydrate) was added to the suspension derived from the first extraction. The tube was closed, shaken vigorously by hand for 1 min, and stirred for 10 min at 3500×g in a tube-oscillating stirrer, and finally samples were centrifuged for 5 minutes. The supernatant was transferred to a test tube with stopper; filtered extract to the vial, using a disposable syringe and filter of 0.45 micrometers. Analysis was performed by LC-MS / MS. This type of detection provides good methods of identifying and quantifying numerous pesticides in food extracts. Several reports have recently been published where these techniques were successfully utilized for analysis of pesticides in fruits and vegetables (Payá et al. 2007). The operation of the LC gradient involved two eluent components water/ammonium formate 5 mM and methanol/ammonium formate 5 mM (%). Column temperature was 40 °C and injection volume 5 µL. MS/MS detection was performed in the multiple reaction monitoring modes using an ESI interface in the positive ion mode. Ionization voltage was 5500 V, with nebulizing gas a synthetic air at 60 psi, and curtain gas nitrogen at 30 psi. Solvent evaporation at the source was assisted by a drying gas that was heated synthetic air at 420 °C/ 50 psi.

Statistical Analysis.

Comparisons of lesion area were made by analysis of variance (ANOVA) using PROC GLIMMIX in SAS v. 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). A random-effects model was applied for analysis to chemigation data. Interaction between fungicides and water level factor was determined. A random-effects model was applied for analysis to conventional application (sprayer) associated with adjuvants data, and interaction between fungicides and presence/absence of adjuvants was determined. It was also calculated the interaction between control versus all treatments. For temporal evaluations of fungicide

residual activity, a Dunnett's test ($\alpha=0.05$) was used to compare average lesion size for each fungicide treatment versus the control. Additionally, percent disease control was estimated as:

$$\text{Control (\%)} = \left(\frac{\text{Lesion area of the control} - \text{lesion area of the fungicide}}{\text{Lesion area of the control}} \right) * 100$$

Rate of decay in disease control was made with an analysis of covariance (ANCOVA) using PROC REG and PROC MIXED in SAS v. 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC) for chemigation experiment and conventional application with adjuvants.

Rate of decay in fungicides concentration was made for chromatography values (mg kg^{-1}) with linear regression using ANCOVA. Moreover, it was made linear, polynomial of second degree and third degree regression for each fungicide using PROC MIXED to know the best R-square to explain the rate of decay in fungicide concentration.

The Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) was estimated by average of lesion area of each treatment and each application for chemigation and conventional application with adjuvants. The AUDPC was estimated as follows (Shaner and Finney 1977):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n \left[\frac{X_{i+1} + X_i}{2} \right] * (t_{i+1} - t_i)$$

in which X_i = average of lesion area at the i^{th} observation, X_{i+1} = average of lesion are at the $i^{\text{th}} + 1$ observation, t_i = time (days) at the i^{th} observation, t_{i+1} = time (days) at the $i^{\text{th}} + 1$ observation, n = total number of observation.

RESULTS

Chemigation

The interaction between control versus all fungicide treatments was significant at $\alpha = 0.01$ until 8th day after the first application, with $\alpha = 0.05$ at 10 days after application (DAA), and no significant at 12th DAA (Table 1). It was not significant at 12th day because the average of lesion area of the treatments with fungicide application increased over time, due to reduced residual activity of fungicides, resulting in values closer to the average of lesion area in control treatment. The interaction between fungicides and water levels factor was not significant for any evaluation day.

Results of lesion area were converted to percent disease control, using average data among replication for each day, and fitted with a linear regression (Figs. 1-2). Estimated slope, intercept, and R-squared corresponding to each regression are reported in Table 2. Fit of linear regression (R-squared) were different for fungicides, where 100% of fluazinam treatments had an R-squared ≤ 0.64 and all procymidone treatments had R-squared ≥ 0.77 .

The fungicides factor was significant for all leaf collections, suggesting that the different fungicides used for white mold control have different effect on the residual activity in soybean. For example, at 6 DAA, the average of lesion area for all water levels with fluazinam fungicide was higher ($\bar{x} = 5.61$) than compared at the average in lesion area for all water levels with procymidone ($\bar{x} = 1.41$). In addition, all treatments with fluazinam showed no more residual activity at 4th DAA, while the higher water level (15 mm) with procymidone fungicide just showed absence or lower residual activity at 10th DAA based on the Dunnett's test ($\alpha = 0.05$).

The main effect of water level was significant at 2nd DAA ($\alpha = 0.01$) and 4th DAA ($\alpha = 0.05$). On other days, this factor was not significant. The averages of foliar lesion

areas at 8th DAA were 3.73; 3.81; 3.74 and 3.95 cm² for water level of 3.0, 7.0, 11.0 and 15.0 mm, respectively.

At 4th day after application, every water level with fluazinam fungicide did not show difference from control treatment based on Dunnett's test ($\alpha = 0.05$), and had less than 20% disease control for all water levels (Fig 1A). The procymidone fungicide showed no more residual effect at 10th DAA for highest water level (15 mm) and at 12th DAA for 7.0 and 11.0 mm water level. The water level of 3 mm still had residual activity at 12th DAA. At 12th DAA, disease control was approximately 50% at the water level of 3 mm, while the higher water levels had about 20, 25 and 15% of disease control for water level of 7, 11 and 15 mm, respectively (Figure 1B). Rates of decreasing disease control were calculated for each treatment and showed 15.0 mm had the most rapidly decreasing fungicide effect for both active ingredient after first application (Figure 1A and 1B).

After the second application, treatments with procymidone were collected until the 17th DAA, but the treatments with fluazinam were collected until 13th DAA, because this fungicide did not have residual activity since the 5th DAA. Therefore, the ANOVA for factor fungicide, water levels, the interaction of these factors and the interaction between the control versus all treatments were calculated until the 13th DAA (Table 1). The interaction between control versus all treatments was significant ($\alpha = 0.01$) for every evaluation and the interaction between fungicides and water levels was not significant ($\alpha > 0.05$) for the 3rd and 9th DAA. Difference between irrigation level for each fungicide treatment was tested using an ANCOVA, where comparisons were made to determine differences between treatments with respect to the rate of decay in disease control (day), the irrigation level (treatment), and a combination of both (day*treatment). In all treatments, there was a significant difference in disease control according to day; however,

there was not a significant difference in irrigation level and interaction between rate of decay and irrigation method.

Average rate of decay in disease control (slope) after a single application of procymidone was -6.55 and -9.98 after the second application. However, fluazinam applications did not fit a linear model because the R-squared <0.70.

Area under disease progress curve was estimated from lesion areas for each fluazinam and procymidone treatment (Table 2). Comparisons between irrigation levels within each application of fungicides the lowest irrigation level yielded the smallest AUDPC for all fungicides applications.

Average data AUDPC of lesion area estimated from each successive application made in Pereiras for both fluaziam and procymidone fungicides showed a general trend of decreasing lesion area. However, average AUDPC of lesion area in the first and second application of fluazinam was higher (65.34 and 47.64) than procymidone (34.01 and 13.47).

Conventional application with mineral oil

Analysis of variance was calculated for all fungicides associated with adjuvant over the day after the first application (Table 3). The main effect of adjuvants and the interaction between fungicides and adjuvants were not significantly different for all leaf collections day. At 5th and 7th DAA the treatments with fluazinam and carbendazim, respectively, had no residual effect of fungicide. At 9 DAA all treatments did not have residual activity based on Dunnett's test. Lesion development on leaves treated with procymidone, fluazinam and carbendazim were significantly different up to 7 days after the first application, with average lesion size on the seventh day with fluazinam and carbendazin significantly higher (\bar{x} = 6.91 and 6.84, respectively) than compared with procymidone (\bar{x}

= 4.95; $p = 0.01$). The coefficient of variation decreases over the day, and the interaction between the control versus all treatments was significant ($\alpha = 0.01$) only at 3rd and 5th DAA.

After the second application, almost all leaf collections day were significant at $\alpha=0.01$ and no significant for the interaction between control versus all treatments and the interaction between fungicides and adjuvants, respectively (Table 3). The adjuvants was significant for some days, for example at 8th DAA, the lesion area with adjuvant applied was lower ($\bar{x} = 2.18$) when compared without adjuvant applied ($\bar{x} = 3.10$). Adjuvants application was significant for procymidone because at 23rd DAA procymidone applied with adjuvant remain its residual effect; however the treatment with only procymidone did not have residual activity. For fluazinam, the adjuvant did not prolong the residual effect of fungicide, because at 1st DAA did not have residual effect for this treatment, while the fluazinam application alone kept it residual until 4th DAA. The main effect of fungicides was significant for all leaf collections, suggesting that the different fungicides used for Sclerotinia stem rot control have different effect on the residual activity in soybean. For example, at 10th DAA, the average data of lesion area for procymidone, fluazinam and carbendazim was $\bar{x} = 0.95$, $\bar{x} = 4.02$ and $\bar{x} = 2.19$, respectively. Rates of decreasing disease control were calculated for each treatment and was verified that no adjuvant application had the most rapidly decreasing fungicide effect with procymidone and carbendazin after the second application (Fig. 3D and 3F).

Average rate of decay in disease control (slope) after applications of procymidone was similar to carbendazim, where after the first application were faster rate of decay (-10.06 and -9.92, respectively) than after the second application (-2.35 and -3.18). However, fluazinam applications did not fit a linear model because the R-squared <0.70.

Average AUDPC of lesion area was calculated for each treatment in the first and second applications and it was observed that procymidone showed the lower values (32.00 and 25.39), followed by carbendazim (39.46 and 46.83) and fluazinam (48.85 and 79.88) (Table 4).

Conventional application for chromatography analysis

It was used 5 g per sample to get the chromatography results ($\mu\text{g mL}^{-1}$), after that the results were converted in mg kg^{-1} . It was calculated the concentrations (%) for each day and fungicide assuming the higher value as 100%. The recuperation rate of 0.1 mg kg^{-1} concentration was 78.4, 100.0 and 70.4% and the recuperation rate of 1.0 mg kg^{-1} concentration was 82.1, 97.3 and 70.6% for procymidone, fluazinam and carbendazim, respectively (Table 5). Moreover, it was calculated the rate of decay of concentration for each fungicide to find the best model for each fungicide according the R-square. The best R-square in regression for procymidone, fluazinam and carbendazim was polynomial of third degree ($p=0.0126$), linear ($p<0.0001$) and polynomial of second degree ($p=0.0076$), respectively (Table 5 and Fig. 4).

Difference between fungicides was tested using an ANCOVA, where comparisons were made to determine differences between treatments with respect to the rate of decay in concentration (day), fungicides (treatment), and a combination of both (day*treatment). The interaction was not significant, but there was a significant difference between fungicides ($p=0.0046$) and in decay of concentration according to day ($p<0.0001$), where all treatments showed lower concentration of fungicide at the end of the assessment period.

Rate of decay in the fungicide concentration (slope) after application was -6.80, -6.03 and -5.12, and R-square 0.93, 0.83 and 0.66 for procymidone, fluazinam and carbendazim. Despite that procymidone showed the higher slope, the intercept was higher

(108.68) than fluazinam (79.31) and carbendazim (104.17) and because of this, fluazinam had the most rapidly decreasing fungicide effect, following by procymidone and carbendazim (Fig. 5).

DISCUSSION

Chemigation for white mold control is particularly useful because fungicide reaching the ground reduces apothecial development (Vieira and Silva 2006; Venegas and Saad 2010). A study applied both procymidone and fluazinam fungicides with one application or two applications (45 and 60 days post-emergence) by center pivot in dry bean and showed that two applications provided the best disease control and all treatments reduced the number of sclerotia by up to one tenth of the control (Botelho and Costa 1997). Venegas and Saad (2010) observed that control treatment decreased about 25% in productivity, but no difference was obtained in productivity when using two application technologies (chemigation and sprayer equipment), but the application by chemigation showed the best disease control, fewer apothecia per m² and lower weight of residual sclerotia in harvest. Vieira et al. (2003) using two active ingredients (fluazinam and benomyl), found chemigation provided similar white mold control and similar yields in dry bean when compared with conventional application.

The lower water level of 3 mm with procymidone still had residual activity at 12th day after the first application, which shows that the use of larger water levels decreases the residual period of the active ingredient faster. According to Vieira and Sumner (1999), the trend is that fungicide efficiency decreases with increasing water level, especially above 8 mm. Furthermore, the use of lower water levels during chemigation can increase deposition efficiency of fungicide to foliage (Geary et al. 2004).

Fungicides can be applied with adjuvants to improve spray performance, including persistence on foliage (Hart et al. 1992, Kudisk et al. 1991, Reddy and Locke 1996), coverage, absorption, pesticide translocation, and efficacy (Gent et al. 2003).

QuEChERS and other traditional methods analyze pesticides in foods, where we have applied this method to leaves in order to trace fungicide residues after application. Compared to traditional methods, QuEChERS reduces sample size, amount of laboratory glassware, and requires fewer steps (no blending, filtration, large volume quantitative transfers, evaporation/condensation steps, or solvent exchanges required) (Wilkowka and Biziuk 2011).

Resistant cultivars and chemical control are used for disease control (Bardin and Huang 2001). Several fungicides are considered effective for white mold control and applications are recommended during flowering (Tu 1989). A total of seven fungicides are registered for white mold control in soybean, where fluazinam, procymidone and thiophanate-methyl are most frequently used by farmers in Brazil. Fluazinam is one of the most effective fungicides for *S. sclerotiorum* control (Lemay et al. 2002; Mattherom and Porchas, 2004; Vieira et al. 2012; Mahoney et al. 2014). The phenyl-pyridinamine fungicide, fluazinam, is a broad-spectrum preventive contact fungicide that has little curative or systemic activity. Fluazinam is considered a protectant and must be applied prior to disease onset for best results (Butzler et al. 1998). The mode of action of fluazinam is uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation, consequently halting synthesis of ATP without affecting the respiratory chain and ATP synthesis (Guo et al. 1991; Vitoratos, 2014). With activity at multiple sites, fluazinam is considered to have a low risk of resistance development (Ma and Michailides 2005).

Procymidone is another effective and commonly used dicarboximide fungicide for white mold control. Unlike fluazinam, procymidone can be used as both a preventive and

curative fungicide, with moderate systemic activity. It can be absorbed by roots and translocated to leaves and flowers (Chen et al. 2010), which make them particularly effective (Bradley et al. 2006; Ma et al. 2009). The action site of this fungicide is cytochrome c of the oxidative pathway within the mitochondrion. Due to the site-specific mode of action, dicarboximide fungicides are considered to be at high risk of resistance development (Ma and Michailides, 2005).

The benzimidazole group of systemic fungicides contains four different active ingredients (benomyl, thiophanate-methyl, debacarb, and carbendazim) with the same site specific mode of action with inhibition of nuclear division via inhibition of microtubule assembly during mitosis by binding to β -tubulin protein (Chen et al. 2009, Davidse 1986, Quello et al., 2010, Wong et al. 2008). Resistance to benzimidazole fungicides is conferred by a single nucleotide change in the β - tubulin gene (Ma and Michailides, 2005) and the risk of resistance development generally is considered to be high (Wong et al. 2008).

It was not possible to compare in the same time Quecher methodology with DLA results of lesioned foliar area, because fungi did not show a suitable growth in DLA during this study. Despite of this, it was observed the same trend for activity residual of fluazinam, which decreased in 50% of concentration in the second day evaluated by Quecher methodology. Similarly, it was observed with DLA that fluazinam application resulted quickly decreased of residual activity.

Additional research is needed to fully characterize the effect of fungicide application via irrigation on development of *S. sclerotiorum* sclerotia, where no previous studies have examined their effect on apothecial development, which may be more indicative of disease control ability. Moreover, projects should be developed using different adjuvants to improve the fungicides efficacy. In addition, future works should

compare Quecher methodology with another indirectly methodology as DLA for correlation between fungicide concentration and disease control.

ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledged is financial support provided to T. J. J. Miorini by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES with PhD scholarship. Financial support for research also provided by Arysta LifeScience and Bioagri a Mérieux NutriSciences Company. Special thanks to those assisted with the project, including Dorival Boer Júnior, Anderson Fernando.

LITERATURE CITED

- Abawi, G. S., Polach, F. J., and Molin, W. T. 1975. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathol.* 65:673-678.
- Anastassiades M., Tasdelen B., Scherbaum E., and Stajnbaher D. 2007. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW (eds) Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bardin, S. D., and Huang, H. C. 2001. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 23:88-98.
- Bardin, S. D.; Huang, H. C. 2001. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 23:88-98.
- Boland, G. J. and Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16:93-108.

- Bolton, M. D., Thomma, B.P.H.J., and Nelson, B.D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 7:1-16.
- Botelho, S. A., and Costa, J. L. S. Efeito da dosagem e número de aplicações de fungicidas via pivô central para o controle do mofo branco do feijoeiro. In: Congresso Brasileiro De Fitopatologia, 30, Poços de Caldas, 1997. Abstract p. 252.
- Bradley, C. A., Lamey, H. A., Endres, G. J., Henson, R. A., Hanson, B. K., Mckay, K. R., Halvorson, M., Legare, D.G., and Porter, P. M. 2006. Efficacy of fungicides for control of *Sclerotinia* stem rot of canola. *Plant Dis.* 90:1129-1134.
- Bruhn, J. A., and Fry, W. E. 1982. A statistical model of fungicide deposition on potato foliage. *Phytopathol.* 72:1301-1305.
- Butzler, T. M., Bailey, J. E., and Beute, M. K. 1998. Integrated management of *Sclerotinia* blight in peanut: Utilizing canopy morphology, mechanical pruning, and fungicide timing. *Plant Dis.* 82:1312-1318.
- Chen, C.-J., Yu, J.-J., Bi, C.-W., Zhang, Y.-N., Xu, J.-Q., Wang, J.-X., and Zhou, M.-G. 2009. Mutations in a β -tubulin confer resistance of *Gibberella zeae* to benzimidazole fungicides. *Phytopathol.* 99:1403-1411.
- Chen, L., Li, X., Wang, Z., Pan, C., and Jin, R. 2010. Residues dynamics of procymidone in leeks and soil in greenhouses by smoke generator application. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 73-77.
- Conab. 2015. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 2 – safra 2014/15, n. 8 – oitavo levantamento. Online publication. www.conab.gov.br
- Costa, E.F. da; Vieira, R.F.; Viana, P.A. (Eds.). **Quimigação**. Aplicação de produtos químicos e biológicos via irrigação. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.315

- Cunha, J. P. A. R., and Nascimento, A. P. C. 2013. Aerial, ground and chemigation spray deposition on corn for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciências agrotec.* 37:123-129.
- Cunha, J. P. A. R., Teixeira, M. M., Vieira, R. F., and Barbosa, L. C. A. 2001. Eficácia do fungicida epoxiconazol aplicado via pivô central no feijoeiro. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient* 5:450-455.
- Davidse, L. C. 1986. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:43-65.
- Geary, B., Hamm, P. B.; and Johnson, D.A. 2004. Deposition and redistribution of fungicides applied by air and chemigation for control of late blight in commercial potato fields. *American J. Potato Research*, 81:305-315.
- Gent, D. H., Schwartz, H. F., and Nissen, S. J. 2003. Effect of commercial adjuvants on vegetable crop fungicide coverage, absorption, and efficacy. *Plant Dis.* 87:591-597.
- Guo, Z., Miyoshi, H., Komyoji, T., Haga, T., and Fujita, T. 1991. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chlo-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. *Biochim. Biophys. Acta* 1056:89-92.
- Hamm, P. B., and Clough, G. H. 1999. Comparison of application methods on deposition and redistribution of chlorothalonil in a potato canopy and potential for control of late blight. *Plant Dis.* 83:441-444.
- Hart, S. E., Kells, J. J., and Penner, D. 1992. Influence of adjuvants on the efficacy, absorption, and spray retention of primisulfuron. *Weed Technol.* 6:592-598.
- Johnson D. A., Cummings, T. F., and Hamm, P. B. 2000. Cost of fungicides used to manage potato late blight in the Columbia Basin: 1996 to 1998. *Plant Dis.* 84:399-402.

- Juliatti, F. C., Crato, F. F.; Juliatti, C., Couto, K. R., and Juliatti, B. C. M. 2013. Escala diagramática para avaliação da severidade de mofo branco em soja. *Bioscience J.* 29:676-680.
- Kim, H. S., Hartman, G. L., Manandhar, J. B., Graef, G. L., Steadman, J. R., and Diers, B. W. 2000. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Sci.* 40:665-669.
- Kudisk, P., Mathiassen, S. K., and Kirknel, E. 1991. Influence of formulations and adjuvants on the rainfastness of maneb and mancozeb on pea and potato. *Pestic. Sci.* 33:57-71.
- Kull, L. S., Pedersen, W. L., Palmquist, D., and Hartman, G. L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis* 88:325-332.
- Lemay, A. V., Bailey, J. E., and Shew, B. B. 2002. Resistance of peanut to *Sclerotinia* blight and the effect of acibenzolar-S-methyl and fluazinam on disease incidence. *Plant Dis.* 86:1315-1317.
- Li, Y.; Kim, M. R.; Lee, K. B.; Kim, I. S.; Shim, J. H. 2007. Determination of procymidone residues in ginseng by GC-ECD and GC-MS equipped with a solvent-free solid injector. *Food Control.* 18:364-368.
- Lobo Junior, M., and Abreu M.S. 2000. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. *Ciência e Agrotecnologia*, 24:521-526.
- Mahoney, K. J., McCreary, C. M., and Gillard, C. L. 2014. Response of dry bean white mould [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causal organism] to fungicides. *Can. J. Plant Sci.* 94:905-910.

Mattherom, M. E., and Porchas, M. 2004. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Dis.* 88:665-668.

Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 24:853-863.

Mendonça, C.G., Raetano, C.G., and Mendonça, C.G. 2007. Tensão superficial estática de soluções aquosas com óleos minerais e vegetais utilizados na agricultura. *Engenharia Agrícola* 27:16-23.

Meyer, M.C., Campos, H.D., Godoy, C.V., and Utiamada, C.M. (Ed.). 2014a. Ensaio cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012. Londrina: Embrapa Soja. 100 p. (Embrapa Soja. Documentos, 345).

Meyer, M. C., Godoy, C. V., and Campos, H. D. 2014b. Lucro mofado. *Cultivar Grandes Culturas*, 15:22-24.

Meyer et al., **Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2013/2014** – resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015, p.1 – 4 (Circular Técnica, 109).

Mueller, D. S., Dorrance, A.E., Derksen, R. C., Ozkan, E., Kurle, J. E., Grau, C.R., Gaska, J. M., Hartman, G. L., Bradley, C. A., and Pedersen, W. L. 2002. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potencial for control of sclerotinia stem rot on soybean. *Plant Dis.* 86:26-31.

Mueller, D. S., Hartman, G. L. And Pederson, W. L. 1999. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. *Plant Dis.* 83:1113-1115.

- Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., and Barba, A. 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 389:1697-1714.
- Pinto, N. F. J. A., and Costa, E. F. 1999. Aplicação de fungicidas via água de irrigação para o controle da ferrugem-do-feijoeiro-comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:317-321.
- Quello, K. L., Chapman, K. S., and Beckerman, J. L. 2010. In situ detection of benzimidazole resistance in field isolates of *Venturia inaequalis* in Indiana. *Plant Dis.* 94:744-750.
- Reddy, K. N., and Locke, M. A. 1996. Imazaquin spray retention, foliar washoff and runoff losses under simulated rainfall. *Pestic. Sci.* 48:179-187.
- Shaner, G., and Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathol.* 67:1051-1056.
- Tolentino Junior, J. B., Rezende, R., Itako, A. T., Freitas, P. S. L., and Frizzone, J. A. 2011. Drip fungigation in early blight control of tomato. *Acta Scientiarum Agron.* 33: 9-14.
- Tu, J.C. 1989. Management of white mold of white beans in Ontario. *Plant Dis.* 7:281-285.
- Venegas, F., and Saad, J. C. C. 2010. Fungigação no controle do mofo branco e produtividade do feijoeiro em condições de cerrado brasileiro. *Irriga* 15:159-172.
- Vieira, R. F., and Sumner, D. R. 1999. Application of fungicides to foliage through overhead sprinkler irrigation – a review. *Pesticide Sci.* 55:412-422.
- Vieira, R. F., Pinto, C. M. F., and Paula Junior, T. J. 2003. Chemigation with benomyl and fluazinam and their fungicidal effects in soil for white mold control on dry beans. *Fitopatologia Brasileira* 28:245-250.

Vieira, R. F., and Silva, A. A. 2006. Aplicação de defensivos via água de irrigação por aspersão. In: Vieira, C., Paula Júnior, T. J., And Borém, A. (Ed.). **Feijão**. 2 ed. Viçosa: UFV, 259-308.

Vieira, R. F., Paula Júnior, T. J., Carneiro, J. E. S., Teixeira, H., and Queiroz, T. F. N. 2012. Management of white mold in type III common bean with plant spacing and fungicide. *Trop. Plant Pathol.* 37:95-101.

Vitoratos, A. G. 2014. Mode of action and genetic analysis of resistance to fluazinam in *Ustilago maydis*. *J. Phytopathol.* 162:737-746.

Wilkowska, A., and Biziuk, M. 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*.125:803-812.

Wong, F. P., de la Cerda, K. A., Hernandez-Martinez, R., and Midland, S. L. 2008. Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. *Plant Dis.* 92:239-246.

TABLES

Table 1. Average of lesion area in leaves (cm²) evaluated 48 hours after *S. sclerotiorum* inoculation, in soybean plants after first and second application by chemigation over the days in Pereiras, 2014.

Treatments	Days after application (DAA)						
	First application (01/09/2014)			Second application (01/23/2014)			
	4 th	10 th	12 th		3 th	5 th	17 th ⁵
Control	6.30	5.94	5.21	Control	3.70	3.67	2.62
F (15 mm) ¹	6.69 ^{ns}	5.74 ^{ns}	5.30 ^{ns}	F (10 mm) ²	3.53 ^{ns}	4.41 ^{ns}	-
F (11 mm)	6.82 ^{ns}	5.41 ^{ns}	5.49 ^{ns}	F (7.5 mm)	3.76 ^{ns}	3.46 ^{ns}	-
F (7 mm)	5.74 ^{ns}	5.30 ^{ns}	5.87 ^{ns}	F (5 mm)	3.07 ^{ns}	4.01 ^{ns}	-
F (3 mm)	5.08 ^{ns}	5.92 ^{ns}	5.77 ^{ns}	F (2.5 mm)	1.73	4.04 ^{ns}	-
P (15 mm)	2.70	5.11 ^{ns}	4.44 ^{ns}	P (10 mm)	0.48	0.93	1.26
P (11 mm)	1.74	4.15	3.89 ^{ns}	P (7.5 mm)	0.38	0.59	1.68 ^{ns}
P (7 mm)	1.87	3.91	4.16 ^{ns}	P (5 mm)	0.33	0.74	2.01 ^{ns}
P (3 mm)	1.55	3.99	2.78	P (2.5 mm)	0.14	0.72	1.21
CV (%) ³	27.45	29.08	24.35	CV (%)	34.95	25.66	47.01
R-square	0.84	0.46	0.64	R-square	0.87	0.88	0.53
Cont vs T ³	** ⁴	*	ns	Cont vs T ³	**	**	-
Fungicides	**	**	**	Fungicides	**	**	-
Water level	* ⁴	ns	ns	Water level	**	*	-
Fung*W ³	ns ⁴	ns	ns	Fung*W ³	* ⁴	ns	-

Averages of lesion area followed by ^{ns} did not differ from control treatment based on Dunnett's test ($\alpha < 0.05$). ¹F = fluazinam; P = procymidone; 3.0, 7.0, 11.0 and 15.0 mm = water levels used after first chemigation. ²2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mm = water levels used after second chemigation. ³CV (%) = coefficient of variance. Cont vs T = interaction between control versus all treatments. Fung*W = interaction between fungicides and water level factors. ⁴** ($\alpha = 0.01$); * ($\alpha = 0.05$); ns (no significant). ⁵At 15th and 17th, it was collected leaves just for procymidone treatments.

Table 2. Linear regression analysis of disease control by procymidone and fluazinam at four irrigation levels (3.0, 7.0, 11.0, and 15.0 mm) in the first application, and four irrigation levels (2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 mm) in the second application at the Pereiras soybean field site in 2014, with corresponding Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) calculated by lesion area for each treatment.

Application	Fungicide	Irrigation level (mm)	Linear regression			Test statistic (p-value)			AUDPC
			Slope	Interc	R-square	Day	treat	Int.	
First	Fluaz	3	-5.24	50.60	0.64	0.0012	0.0912	0.184	59.09 B
		7	-2.20	25.39	0.57				64.58 AB
		11	-1.48	16.43	0.28				68.53 AB
		15	-1.47	14.66	0.37				69.16 A
	Proc	3	-4.41	88.90	0.77	<.0001	0.7970	0.946	27.83 B
		7	-4.74	82.77	0.80				33.46 AB
		11	-4.75	82.09	0.88				34.22 AB
		15	-5.32	76.83	0.86				40.53 A
Second	Fluaz	2.5	-5.01	50.75	0.64	0.0001	0.0575	0.162	45.32
		5.0	-3.36	33.24	0.54				46.00
		7.5	-1.05	11.15	0.48				48.46
		10.0	-2.14	20.89	0.44				50.76
	Proc	2.5	-2.71	96.17	0.91	<.0001	0.2166	0.946	10.61 B
		5.0	-2.49	86.93	0.79				13.08 AB
		7.5	-2.41	82.82	0.80				14.58 A
		10	-2.54	84.54	0.89				15.59 A

Table 3. Average of lesion area in leaves (cm²) evaluated 48 hours after *S. sclerotiorum* inoculation, in soybean plants after first and second conventional application with adjuvants over the days in Pereiras, 2014.

Treatments ¹	Days after application (DAA)						
	First application			Second application			
	5 th	7 th	9 th	1 st	6 th	19 th	23 rd
Control	5.14	7.08	5.29	5.41	3.84	2.79	2.34
P	1.67	4.95	4.32 ^{ns}	0.40	0.72	1.69	1.85 ^{ns}
P + adj.	2.12	4.94	4.08 ^{ns}	0.46	0.15	0.91	0.77
F	3.51 ^{ns}	7.61 ^{ns}	4.86 ^{ns}	2.24	4.25 ^{ns}	2.94 ^{ns}	2.69 ^{ns}
F + adj.	4.89 ^{ns}	6.20 ^{ns}	4.92 ^{ns}	4.02 ^{ns}	3.32 ^{ns}	2.29 ^{ns}	2.17 ^{ns}
C	1.94	7.24 ^{ns}	4.09 ^{ns}	1.06	1.94	2.39 ^{ns}	2.16 ^{ns}
C + adj.	2.81	6.44 ^{ns}	4.52 ^{ns}	1.24	1.63	2.27 ^{ns}	2.15 ^{ns}
CV (%) ²	43.18	25.50	24.27	61.29	40.78	35.83	39.33
R-square	0.55	0.47	0.38	0.78	0.77	0.64	0.47
Cont vs T ²	** ³	ns	* ³	**	**	*	ns
Fungicides	**	**	ns	**	**	**	**
Adjuvants	ns ³	ns	ns	ns	*	*	**
Fung*adj.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*

Averages of lesion area followed by ^{ns} did not differ from control treatment based on Dunnett's test ($\alpha < 0.05$). ¹F = fluazinam; P = procymidone; C = carbendazim; adj. = adjuvant (mineral oil). ²CV (%) = coefficient of variance. Cont vs T = interaction between control versus all treatments. Fung*adj. = interaction between fungicides and adjuvants. ³** ($\alpha = 0,01$); * ($\alpha = 0,05$); ns (no significant).

Table 4. Linear regression analysis of disease control by procymidone, fluazinam and carbendazim associated or no with mineral oil, by conventional application (sprayer), and with up to two applications at the Pereiras soybean field site in 2014, with corresponding Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) calculated by lesion area for each treatment.

Application	Fungicide	Adj	Linear regression			Test statistic (p-value)			AUDPC
			Slope	Intercept	R-squ	Day	treat	Int.	
First	Proc	N	-10.19	118.05	0.87	0.0009	0.9236	0.9399	31.91 C
		Y	-9.93	115.57	0.86				32.08 C
	Fluaz	N	-7.11	72.53	0.68	0.0218	0.5688	0.6660	48.01 AB
		Y	-5.28	54.20	0.53				49.69 A
	Carb	N	-10.14	108.20	0.70	0.0063	0.8371	0.9303	38.59 BC
		Y	-9.70	100.37	0.79				40.32 ABC
Second	Proc	N	-3.09	93.25	0.91	<.0001	0.1937	0.0074	36.66 C
		Y	-1.60	101.84	0.72				14.12 D
	Fluaz	N	-1.91	30.92	0.44	0.0226	0.2928	0.1062	83.74 A
		Y	-0.37	18.31	0.13				76.01 A
	Carb	N	-3.18	77.43	0.89	<.0001	0.5072	0.9925	49.66 B
		Y	-3.18	81.95	0.92				44.00 BC

Table 5. Results of chromatography (mg kg^{-1}), rate of decay in the fungicide concentration, recuperation rate of 0.1 and 1.0 mg kg^{-1} concentrations and linear, polynomial of second degree and polynomial of third degree regression analysis of rate of decay in procymidone, fluazinam and carbendazim fungicides concentration; linear regression analysis of rate of decay in the fungicide concentration by each fungicide application on soybean at the Pereiras field site in 2014.

DAA ¹	Treatments					
	Procymidone		Fluazinam		Carbendazin	
	mg kg^{-1}	Rate of decay (%)	mg kg^{-1}	Rate of decay (%)	mg kg^{-1}	Rate of decay (%)
0	58.98	98.86	16.26	100.00	34.97	87.78
2 th	59.66	100.00	7.35	45.17	34.42	86.40
4 th	55.06	92.30	10.83	66.57	39.84	100.00
6 th	36.89	61.84	6.14	37.76	28.72	72.11
8 th	39.02	65.42	4.34	26.70	39.85	100.0
10 th	21.31	35.72	1.91	11.74	19.50	48.96
12 th	9.67	16.21	0.72	4.42	11.47	28.78
14 th	11.22	18.81	1.25	7.70	9.39	23.57
Rec. 0.1	78.4%		100.0%		70.4%	
Rec. 1.0	82.1%		97.3%		70.6%	
	Model – Rate of decay of fungicide concentration					
Linear	<0.0001		<0.0001		<0.0001	
Polym 2	0.2493		0.0556		0.0076	
Polym 3	0.0126		0.8650		0.5010	
	Linear model					
R-square	0.93		0.83		0.66	
Intercept	108.68		79.31		104.17	
Days (slope)	-6.80		-6.03		-5.12	
Days						<0.0001
Treatments						0.0046
Days*treatments						0.3059

¹DAA = days after application.

FIGURES

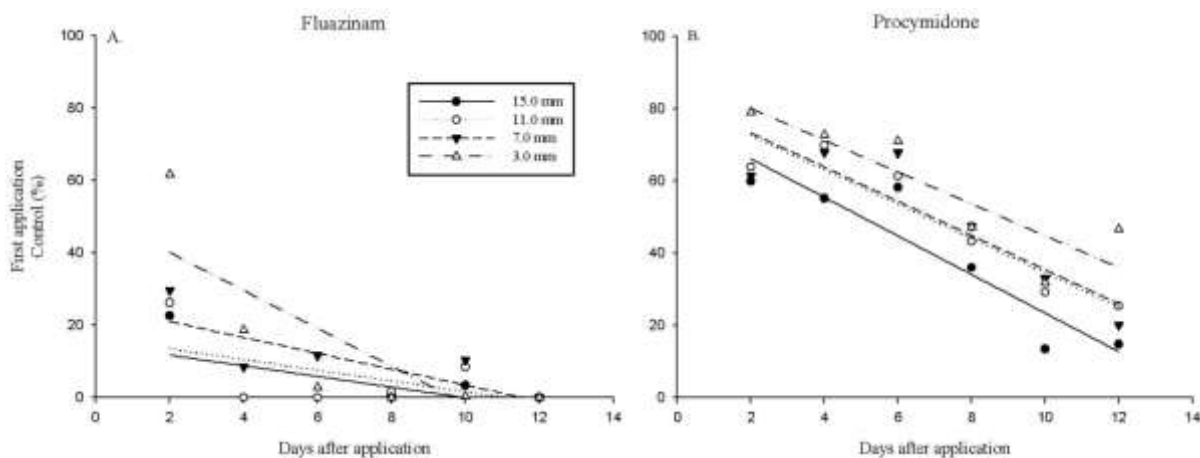


Figure 1. White mold disease control under fluazinam (left) and procymidone (right) treatment applied at four irrigation levels (3.0, 7.0, 11.0, and 15.0) in the first application on soybean at the Pereiras field site in 2014; lines are fitted linear regression.

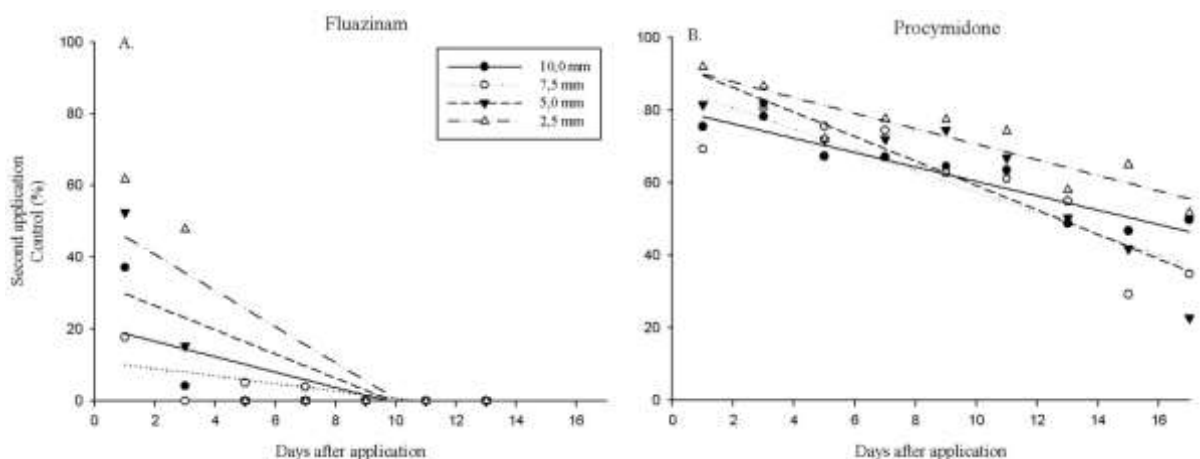


Figure 2. White mold disease control under fluazinam (left) and procymidone (right) treatment applied at four irrigation levels (2.5, 5.0, 7.5, and 10.0) in the second application on soybean at the Pereiras field site in 2014; lines are fitted linear regression.

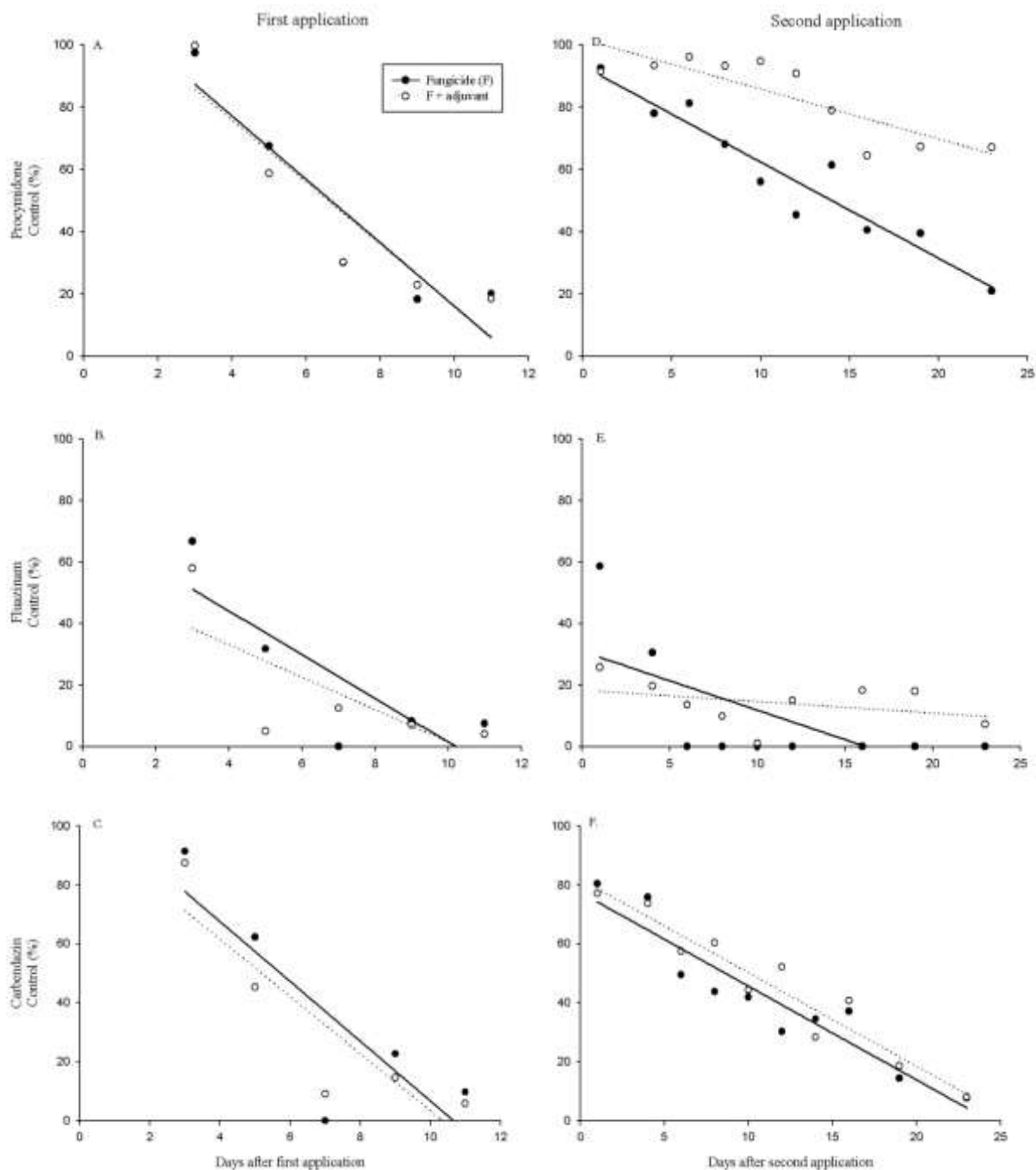


Figure 3. White mold disease control under procymidone (top), fluzinam and carbendazim (lower) treatment applied with or no adjuvants in two successive applications (left, right) on soybean at the Pereiras field site in 2014; lines are fitted linear regression.

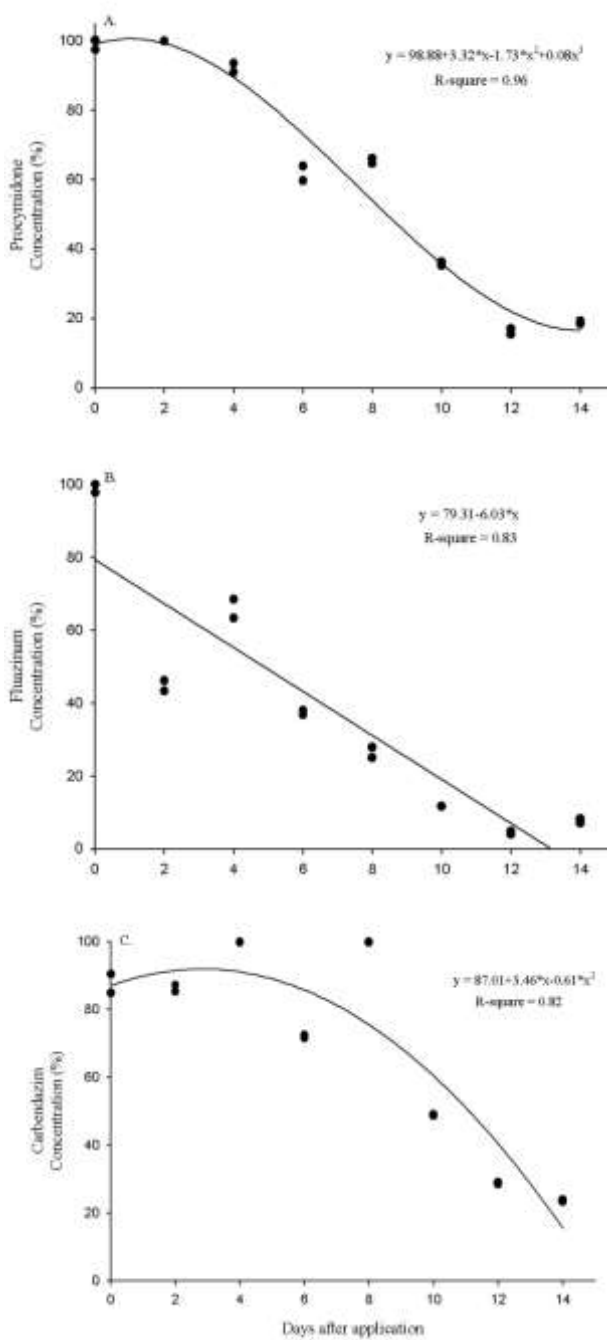


Figure 4. Rate of decay in fungicide concentration for procymidone (A), fluazinam (B) and carbendazim (C) applied in soybean with their best model and R-square.

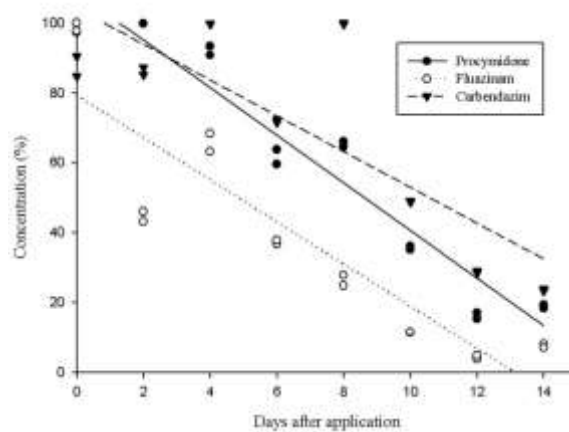


Figure 5. Rate of decay in concentration of procymidone, fluazinam and carbendazim fungicides after conventional application (sprayer) applied in soybean at the Pereiras field site in 2014; lines are fitted linear regression.

Research Article**Capítulo III “RESIDUAL ACTIVITY OF FUNGICIDES APPLIED BY
CHEMIGATION FOR WHITE MOLD CONTROL IN DRY BEAN”**

T. J. J. Miorini and **C. G. Raetano**, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil; **S. E. Everhart**, Department of Plant Pathology, University of Nebraska, Lincoln, NE, USA

Corresponding author: Sydney E. Everhart, everhart@unl.edu

Miorini, T. J. J., Raetano, C. G., and Everhart, S. E. 201X. Residual effect of fungicides applied by chemigation for white mold control in dry bean. *Plant Dis.* XX:XXX-XXX.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is a necrotrophic fungal pathogen that causes white mold of dry edible bean (*Phaseolus vulgaris*). Chemical control can be performed through conventional sprayer application or by chemigation, but questions remain regarding the effect of application method on residual fungicide activity in the plant. Our goal was to determine 1) if irrigation level or application method affect fungicides residues in days after application using a detached leaf bioassay and 2) whether this was different for a contact (fluazinam) versus systemic fungicide (procymidone). A secondary goal was to determine if application method affects the number of sclerotia, incidence and yield in the field. Three field experiments were carried out at two locations in São Paulo, Brazil in 2013 and 2014,

and leaves were collected in 2 day intervals after application. Rate of disease suppression, regardless of fungicide or application, decreased over time, as demonstrated by regression analysis where all slopes were negative. Area under disease progress curve (AUDPC) revealed the lowest irrigation level (2.5 and 3.0 mm) resulted in the lowest total lesion area in five of six groups treated with fluazinam and four out of five groups treated with procymidone, thus supporting the conclusion that application of fungicides at lower irrigation levels enables greater disease control. Conventional application of fungicides using hand-carrier compression sprayer showed that AUDPC resulted in the smallest lesion area, which was significantly smaller than for fungicide treatments applied at the highest irrigation level. Fungicides can influenced yield and formation *S. sclerotiorum* sclerotia, where procymidone showed lower sclerotia development than fluazinam in the 2013 and 2014 crop seasons.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phaseolus vulgaris*, fluazinam, procymidone, detached leaf assay

INTRODUCTION

Brazil is the world's leading producer and consumer of dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). More than half of dry beans are produced in three Brazilian states: Paraná, Minas Gerais, and Mato Grosso do Sul (Conab 2015). Dry bean can be seeded year-round but in some regions there is irregular rainfall, which can be limiting because dry bean is a water-sensitive crop (Guimarães et al. 2006). Consequently, irrigation of dry bean is necessary in almost all production regions of Brazil.

Several pathogens cause yield-limiting disease on dry bean in Brazil, including *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causal agent of white mold. White mold is

widespread and is important in many countries including Canada (Bardin and Huang 2001), the USA (Bolton et al. 2006), Australia (Lethan et al. 1976) and Brazil (Vieira et al. 2010, Paula Júnior et al. 2009a, Lehner et al. 2015). Control of *S. sclerotiorum* is particularly challenging because it causes disease on over 400 species of plants worldwide including important crops and numerous weeds (Boland and Hall 1994). In addition, *S. sclerotiorum* is able to survive in the soil as sclerotia for many years. Sclerotia are able to germinate asexually in soil or reproduce sexually, producing apothecia capable of releasing wind-blown ascospores that colonize flowers and are the primary mode of infection. Secondary infection of leaves, petioles and stems is by mycelium through direct contact with infected flowers (Abawi et al. 1975). An integrated disease management approach for *S. sclerotiorum* control is recommended, including use of certified seeds, crop rotation with a non-host monocot crop, selection of upright cultivars, tilling soil, routine cleaning of agricultural implements, biological control, and fungicidal control (Harikrishnan and Del Río, 2006, Miklas et al. 2013, Paula Júnior et al. 2009b, Paula Júnior et al. 2012, Vieira et al. 2003, Vieira et al. 2010, Vieira et al. 2012, Lehner et al. 2015).

Efficacy of fungicide applications for white mold control may be influenced by a number of factors, such as fungicide penetration to the lower canopy, timing of fungicide application (Morton and Hall 1989), and fungicide degradation by alkaline hydrolysis (Ferrel 2002). Up to seven fungicides are currently registered for white mold control in common dry bean, where fluazinam and procymidone are two of the three most frequently used by Brazilian farmers (Lehner et al. 2015).

The phenyl- pyridinamine fungicide fluazinam is one of the most effective fungicides for *S. sclerotiorum* control (Lemay et al. 2002, Matherom and Porchas 2004, Vieira et al. 2012, Mahoney et al. 2014). This is a broad-spectrum preventive contact fungicide that has little curative or systemic activity. Fluazinam is considered a protectant

and must be applied prior to disease onset for best results (Butzler et al. 1998). The mode of action of fluazinam is uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation, consequently halting synthesis of ATP without affecting the respiratory chain and ATP synthesis (Guo et al. 1991, Vitoratos, 2014). With activity at multiple sites, fluazinam is considered to have a low risk of resistance development (Ma and Michailides, 2005).

Procymidone is another effective and commonly used dicarboximide fungicide for white mold control. Unlike fluazinam, procymidone can be used as both a preventive and curative fungicide, with moderate systemic activity. Absorbed by roots, it can be translocated to leaves and flowers (Chen et al. 2010), which make it particularly effective (Bradley et al. 2006, Ma et al. 2009). The target site of this fungicide is cytochrome c of the mitochondrial oxidative pathway. Due to the site-specific mode of action, dicarboximide fungicides are considered to be at high risk of resistance development (Ma and Michailides, 2005).

Fungicide application in dry bean is typically made either via sprayers or chemigation. Large volumes of irrigation water are used during chemigation, approximately 25,000 to 58,400 L ha⁻¹ as compared with 47 L ha⁻¹ for aerial application (Bruhn and Fry 1982, Hamm and Clough 1999). Consequently, aircraft application results in higher initial fungicide residue levels because there is no dilution effect as compared with application via irrigation (Hamm and Clough 1999). For white mold control, some studies suggest chemigation facilitates better ground penetration and reduces apothecial development (Venegas and Saad 2010). For example, one study applied both procymidone and fluazinam fungicides and showed a reduced number of sclerotia by up to one tenth of the control (Botelho and Costa, 1997). Over the past few years, chemigation has increased primarily due to lower cost compared with aircraft application (Johnson et al. 2000). Chemigation has been shown effective for disease control of rust in dry bean (Pinto and

Costa 1999), angular leaf spot and alternaria spot in dry bean (Cunha et al. 2001), and early blight in tomato (Tolentino Jr. et al. 2011).

A major limitation to previous studies is that none characterized residual fungicide activity for disease control, which is important for determining the window of fungicide activity that is used to make recommendations regarding application frequency. Agrochemical residue analysis can be performed using analytical techniques such as gas chromatography and high performance liquid chromatography or bioassays such as use of a detached leaf assay (Augusto and Breneman 2012, Mueller et al. 2002). In the latter method, plants are treated with fungicides and leaves are harvested for inoculation with the pathogen under controlled-environment conditions, allowing quantification of necrotic lesion formation (Mueller et al. 2002). This method has been used to compare fungicide treatments applied in the greenhouse, but no previous studies have used this method to assess residual fungicidal activity over time or under field conditions. Thus, our primary objective was to apply the detached leaf assay to estimate the rate of decay in disease suppression ability of two fungicides with different modes of action and movement, fluazinam and procymidone, applied with different irrigation levels (chemigation). Secondary objectives were to compare effectiveness of chemigation to conventional application for dry bean yield and number of *S. sclerotiorum* sclerotia produced on plants and in soil. Collectively, these results are important for understanding the impact of chemigation on white mold disease development, specifically with respect to residual fungicide activity and for making recommendations on timing of successive applications for effective disease control.

MATERIALS AND METHODS

Field sites

Field experiments were conducted using the dry bean cultivar *P. vulgaris* 'Carioca'. One field site was located at the farmer-cooperator managed Cercadinho Farm in Itaí, SP, Brazil, where plots were center pivot-irrigated, with a total irrigated area of 59.7 ha. Dry bean was planted with 0.50 m between rows and each plot had eight rows that were 5.5 m long, totaling 22 m² in area. Another field site was at the Agricultural Research and Development Center (CPDA) at Arysta LifeScience in Pereiras, SP, Brazil, where plots were irrigated using a Naandan 435 0.0127 m sprinklers. Sprinklers were limited to move in an area 180° (half circle) and with a radius of 6 m, totaling approximately 56.5 m² of each plot at CPDA experiments. Experiments were conducted at both field site locations in 2013 and 2014, but only Pereiras in 2014 due to constraints prohibiting farmer-cooperator participation at Itaí, SP.

Fungicide Applications

The experimental design for the Itaí field site used randomized blocks with 4 treatments of fluazinam with three irrigation levels: 2.53, 5.07 and 10.13 mm water applications. Fungicide fluazinam was applied at 1 L ha⁻¹ commercial product. The control treatment was no fungicide and no additional irrigation, which was achieved by covering plots with plastic during chemigation in different randomly selected locations. Treatments were replicated 4 times and marked in the field with stakes. Fungicide was injected into the center pivot was using an Injeferd (Solomaq, Uberaba, MG), which is an instrument used to inject solid and water soluble agrochemicals into the center pivot pipeline during irrigation. This instrument has an advanced dilution and dosing system that allows controlled application into flowing water applying about 25 kg min⁻¹. During the course of

the experiment, only a single fungicide application at flowering stage was permitted due to lack of disease and thus, prohibitive cost to farmer-cooperator.

Experimental design for the Pereiras site used randomized blocks with factorial treatments of fluazinam and procymidone with three irrigation levels in 2013 (3.0, 4.5 and 6.0 mm) and four irrigation levels in 2014 (2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 mm), with conventional application as an additional treatment in 2014. Fungicide applications were carried out at the maximum dose recommended for each commercial product and application method used. Both fluazinam and procymidone were applied in conventional application at 1.5 L kg ha⁻¹ commercial product and via chemigation were applied at 1.5 and 2.0 kg ha⁻¹, respectively. The control treatment was no fungicide application and no additional irrigation. During 2013, disease pressure was high, requiring three fungicide applications beginning at 50% full bloom and intervals of approximately 15 days thereafter. During 2014, disease pressure was low, requiring only two fungicide applications, with first application at 50% full bloom and second application 16 days later. Fungicides applied via chemigation used sprinklers connected by 0.0127 m hoses to a tank of 2,000 L. The hose was connected to the tractor's power tie-off set to 540 rpm with pressure gauge set around 3 bars. For each treatment, the commercial product and water were added to the tank in the amount needed to make four applications, with sprinklers limited to a 180° rotation with a radius of 6 m, totaling approximately 56.5 m² for each plot. Conventional application was made using a knapsack sprayer pressurized with CO₂ equipped with spray boom of 2.5 m and single flat fan nozzles (TeeJet XR 11004, Spraying Systems Co., Glendale Heights, IL). The nozzles were spaced of 0.5 m and the rate application was 1,000 L ha⁻¹, which is recommended for white mold control in labels.

Detached Leaf Assay

Three trifoliolate leaves fully expanded from each plot in each treatment were collected from the upper plant canopy in each experiment. Leaves were collected 1 day after fungicide treatment in the Itaí experiment and every 2 days thereafter, for a total of six collections over the 11 days post-application period, for a total of 288 leaves. Leaves from the Pereiras site were collected 2 days after each fungicide application and every two days thereafter. Thus, in 2013, there were five collections in each 10-day post-application period, for a total of 15 leaf collections for each of the seven treatments and three fungicide applications, for a total of 1,260 leaves. In 2014, there were eight leaf collections made in each 16-day post-application period, for a total of 16 leaf collections for each of the 11 treatments and two fungicide applications, for a total of 2,112 leaves. The youngest fully expanded trifoliolate leaves were collected and immediately transported to the laboratory. To test for residual fungicidal activity, we used the detached leaf assay, reported by Leone and Tonneijck (1990), and similar to methods used previously with *S. sclerotiorum* resistance studies in soybean (Kim et al. 2000; Kull et al. 2004) and dry bean (Kull et al. 2003).

The petiole of each leaf was pushed through a test tube (12 x 75 mm) with tap water and a bung lid on top with a central hole to allow the entrance of the leaf petiole. Four paper towels were placed in the bottom of each aluminum pan "D100" (515 mm x 355 mm x 73 mm). Four glass petri dishes (100 x 15 mm) were placed upside down in each aluminum pan on paper towels to serve as platforms for each leaf. Four trifoliolate leaves were placed in an aluminum pan with the middle leaf over each glass petri dish. Experimental design in the laboratory was a partially-balanced incomplete block design.

Inoculations were performed to simulate natural infection resulting from direct contact infection, using *S. sclerotiorum* mycelium. The isolate used for inoculations was originally collected from dry bean at the CPDA site at Pereiras in 2012. For inoculations,

an actively growing culture was transferred to potato dextrose agar (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD) and after 48 hours, a 6 mm diameter plug was placed onto each middle trifoliate leaflet with mycelia in contact with the leaf. Twelve leaflets from each experimental treatment were inoculated. After inoculations, 300 mL of water was added to each aluminum pan and to maintain humidity, enclosed with stretchable PVC film 450 mm wide (Alpes – Indústria e Comércio de Plásticos Ltda., São Paulo, SP). Moist chambers were maintained at ambient room temperature (25 ± 2 °C) and after 48 hours, evaluations were performed. To estimate necrotic lesion area, a digital image of each leaf was analyzed with software Image J (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Actual size of each lesion was estimated by including a grid of known size (1 cm) in each photo for digital image software calibration.

Disease Incidence, Yield, and Residual Sclerotia

Estimates of disease incidence, yield, and residual sclerotia were evaluated at the Pereiras site in 2013 and 2014. Incidence of white mold was evaluated 80 days after emergence, estimated as the percentage of plants with visible white mold symptoms within each plot of 28 m² in 2013. In 2014, all plants within an area of 16 m² (2 x 8 m) were evaluated 80 days after emergence. To estimate yield, plants were harvested when 90% of the pods were dry. Dry bean plants were uprooted manually in an area of 28 m² (3.5 m x 8 m length) and air-dried in the field for about 4 days. Dry beans were threshed and stored in labeled paper bags. Weight of beans was measured using an electronic balance and water content measured with a portable device (Moisture Match, Deere & Company Moline, Illinois). Weights were adjusted to 13% relative moisture and converted to kg ha⁻¹, as described by Bezerra (1992). Quantification of sclerotia on plants and in soil was estimated for each treatment. After dry bean harvest, all sclerotia on plants in an area of 28 m² in

each plot were manually collected and weighed. Sclerotia in soil in a 0.25 m² plot to 5 cm depth (approx. 12.5 L) soil were manually counted.

Statistical Analysis

Percent disease control was estimated as the difference between lesion area of the control and treatment, expressed as a percent of lesion area of the control. Comparisons of fitted lines were performed using an analysis of covariance (ANCOVA) with PROC REG and PROC MIXED in SAS v. 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). This analysis is used to determine if there is a significant difference in estimated parameters (slope or intercept) and whether there is an interaction. Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) with the average of lesion area of each treatment and each application for all experiments was estimated according to (Shaner and Finney 1977):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n \left[\frac{X_{i+1} + X_i}{2} \right] * (t_{i+1} - t_i)$$

in which X_i = average of lesion area at the i^{th} observation, X_{i+1} = average of lesion are at the $i^{th} + 1$ observation, t_i = time (days) at the i^{th} observation, t_{i+1} = time (days) at the $i^{th} + 1$ observation, n = total number of observation. Results from each treatment were compared in an analysis of variance (ANOVA), with Tukey's post-hoc test, performed using PROC GLIMMIX in SAS v. 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Additionally, difference within fungicides from year-to-year and difference between fungicides were calculated from average of slope (where $R^2 > 0.70$) and average AUDPC for days 2-10, for the first and second application in Pereiras-2013 and Pereiras-2014. Significant difference was determined with Welch's t-test, which is suitable for two-sample comparisons with unequal variance and unequal sample sizes using PROC GLM in SAS v. 9.4. Comparisons of yield, number of sclerotia in soil, weight of sclerotia after dry

bean harvest and disease incidence were made using an analysis of variance (ANOVA) using PROC GLIMMIX in SAS v. 9.4. A random-effects model was applied to the Pereiras site data. Interaction between fungicides and water rate factor was determined for Pereiras-2013 data and between fungicides and application method for Pereiras-2014; interaction between the control versus all treatments was also calculated.

RESULTS

Applications of fluazinam and procymidone at different irrigation levels were made in 2013 and 2014. In 2013, fluazinam was applied once via irrigation at the Itaí field site at three irrigation levels (2.53, 5.07, and 10.13 mm), whereas both fluazinam and procymidone were applied independently three times at the Pereiras field site with irrigation levels (3.0, 4.5, and 6.0 mm). In 2014, two applications of fluazinam and procymidone were independently made at four irrigation levels, along with a conventional application. Each treatment was replicated in four plots and three leaves were collected from each plot in 2 day intervals after treatment in order to determine residual fungicidal activity using a detached leaf assay, where a grand total of 3,660 leaves were used in this study.

Results of lesion area were converted to percent disease control, averaged among replicates for each day, and fitted with a linear regression (Figs. 1-3). Estimated slope, intercept, and R-squared corresponding to each regression are reported in Table 1 for treatments with fluazinam and Table 2 for procymidone. Fit of linear regression (R^2) were similar for both fungicides, where 13 of 22 fluazinam treatments had a $R^2 \geq 0.70$ and 11 of 19 procymidone treatments had $R^2 \geq 0.73$.

Difference with respect to irrigation level for each fungicide treatment was tested using an ANCOVA, which included separate comparisons among rate of decay in disease

control (day), irrigation level (treatment), and a combination of both (day*treatment). No treatments showed an interaction between rate of decay and irrigation level (data not shown). All treatments showed a significant difference in disease control according to day, with lower disease control observed at the end of each assessment period. Comparisons according to irrigation level showed most were not significantly different. Exceptions were first applications at Pereiras in 2014, where significant differences between irrigation levels of both fluazinam ($p=0.0254$) and procymidone ($p=0.0475$) were found.

Average rate of decay in disease control (slope) after a single application via irrigation for fluazinam was -6.55 at Itaí-2013, -9.98 at Pereiras-2013, and -5.97 at Pereiras-2014 (Table 1). Subsequent applications of fluazinam at the Pereiras site resulted in rates of decay in disease control closer to zero, where averages (excluding estimates with $R^2 < 0.60$) of the second and third applications in 2013 were -7.56 and -1.97, and the second application in 2014 was -2.69. The rate of decay in disease control after a single application of procymidone was similar to fluazinam, where disease control at Pereiras-2013 was faster (-7.87) than at Pereiras-2014 (-5.65). The second application of procymidone at Pereiras-2013 resulted in a slightly faster rate of decay in disease control (-8.64); the second application data at Pereiras-2014 did not fit a linear model (R -squared < 0.60).

Area under the disease progress curve was estimated from lesion areas for each fluazinam (Table 1) and procymidone treatment (Table 2). Comparisons between irrigation levels within each application of fungicides showed the lowest irrigation level yielded the smallest AUDPC in five of six groups treated with fluazinam and four out of five groups treated with procymidone. However, in both fungicide treatments, many of these were not significantly different within each group and several failed to show significant difference from the next highest irrigation level. Notable exceptions were first

application of procymidone at Pereiras-2013 ($AUDPC=15.20$) and first application of procymidone at Pereiras-2014 ($AUDPC=60.68$).

Comparison of AUDPC with conventional application was made in Pereiras-2014 for both fluazinam and procymidone. In every case, conventional application yielded the lowest AUDPC for lesion area, which was significantly lower than all other treatments for the first application of fluazinam at Pereiras-2014 ($AUDPC=48.78$) and not significantly different from the lowest irrigation level in the second application of fluazinam at Pereiras-2014 ($AUDPC=21.08$), first and second applications of procymidone at Pereiras 2014 ($AUDPC=50.97$; 9.97)

Average AUDPC of lesion area estimated from each successive application made in Pereiras for both fluazinam (Table 1) and procymidone (Table 2) showed a general trend of decreasing lesion area with successive application of fungicides. For example, average AUDPC of lesion area in irrigation levels at Pereiras-2013 the first application of fluazinam was 15.67 compared with 8.92 and 7.21 in the second and third applications. This trend was also observed at Pereiras-2014, which showed the first application via chemigation was greater ($AUDPC=84.26$) than after the second ($AUDPC=28.55$). The decrease in lesion area in successive fungicide applications was also observed for procymidone. Average AUDPC for each of three procymidone applications at Pereiras-2013 were $AUDPC=21.93$, 14.89, and 11.20, and at Pereiras-2014 the average AUDPC in two successive applications were 78.91 and 23.63. Due to the cumulative nature of the AUDPC measure, direct comparison of AUDPC across years was not possible.

A summary of the difference in rate of decay in disease control (slope) and cumulative lesion area (AUDPC) between years for each fungicide and also between fungicides within the same year is shown in Table 3. Year-to-year differences in rate of decay for fluazinam in the first and second application were not significantly different

(4.01 and 5.25), whereas first application of procymidone was significantly different from 2013 to 2014 (2.31; difference in second procymidone application could not be estimated). Corresponding AUDPC values compared from year-to-year showed a significant difference for the first application of fluazinam (23.95), whereas no others were significantly different. Comparison between fungicides treatments within the same year showed significant difference in the rate of disease control over time in the first application of fungicides in 2013, but showed no significant difference in 2014. Similarly, no difference was observed between fungicides in the second applications or cumulative lesion areas (AUDPC).

Preliminary data on the effect of treatments on the number of *S. sclerotiorum* sclerotia collected in soil, weight of sclerotia after dry bean harvest, disease incidence, and dry bean yield were collected in at the Pereiras field site (Table 4). Both years showed fungicide treatments were significantly better than control (no fungicide treatment) with respect to all categories. A major difference between years is that disease incidence in 2013 (71.3%) under no fungicide treatment was greater than in 2014 (6.6%), however differences in how disease incidence was estimated may have overestimated disease in 2013. Not surprisingly, yield in the control was also considerably lower in 2013 (1,274 kg ha⁻¹) than in 2014 (2,649 kg ha⁻¹). Comparison of fluazinam to procymidone showed yield was significantly different in both years. In 2013, fungicide treatment with procymidone was significantly better than fluazinam in all categories, with fewer *S. sclerotiorum* sclerotia collected in soil, lower weight of sclerotia, lower disease incidence, and higher yield. In 2014, there was no significant difference in number of sclerotia collected in soil or disease incidence between fungicide treatments. Total weight of sclerotia was significantly lower with procymidone but dry bean yield was significantly higher with fluazinam treatment.

DISCUSSION

Our primary objective was to characterize the residual effect of fungicides applied at different irrigation levels, comparing fungicides with different modes of action and movement, fluazinam and procymidone. Results showed that the rate of disease suppression estimated by bioassay, regardless of fungicide or application method, decreased over time, as demonstrated by regression analysis where all slopes were negative (Figs. 1-3; Tables 1-2). Disease control at 2 days after application averaged 86.2% for all treatments, demonstrating full residual activity of the fungicide. After a single fungicide application, percent disease control typically faded to less than 20% control at the end of the assessment period, 10-16 days later. At Pereiras a second fungicide application was in 2013 and 2014 and third application made in 2013, which resulted in subsequent disease control in the bioassay that decreased more slowly, where estimated slopes were closer to zero. In both of these cases, data more often had poor fit with linear regression (R -squared <0.7), which may have been caused by greater variance in small lesion areas when disease control was high. For both fluazinam and procymidone, percent disease control remained highest after the final successive application, which was not lower than 55% control after the third application in 2013 (Fig. 2) and not less than 40% control after the second application in 2014 (Fig. 3). This relative reduced effect of successive fungicides was likely due to a combination of accumulating fungicide residue and greater resistance of older dry bean plants, which was also evidenced in reduced cumulative lesion areas (AUDPC, Tables 1-2).

Irrigation level had little effect on decrease disease control over time, where significant differences by irrigation level were only observed for the first applications of fluazinam and procymidone in 2014 ($p=0.0254$ and 0.0475 ; Tables 1-2). All other treatments showed no significant difference in how rapidly disease control decreased over

time at different irrigation levels. However, cumulative lesion area (AUDPC) revealed the lowest irrigation level resulted in the lowest total lesion area in five of six groups treated with fluazinam and four out of five groups treated with procymidone (exceptions were second application of fluazinam in Pereiras-2014 and third application of procymidone in Pereiras-2013). Although not all pairwise comparisons of AUDPC according to irrigation level were significant, results support a conclusion that application of fungicides at lower irrigation levels enables greater disease control.

Conventional application of fungicides using hand-carrier compression sprayer was made at Pereiras in 2014. This data showed that rate of decay in disease suppression resulted in a significant difference between treatments after the first application ($p=0.0113$ and $p=0.0056$; Tables 1-2) and AUDPC values also were significantly different. In every case, AUDPC showed conventional application resulted in the smallest lesion area, which was significantly smaller than for fungicide treatments applied at the highest irrigation level. Collectively, these results indicate that both lower irrigation level and conventional application slow residual fungicide decay and lesion development. This result is similar to a previous study that showed application of a mix of fluazinam and benomyl to dry bean using either chemigation or conventional application provided similar levels of white mold control (Vieira et al. 2003). Additionally, our results are in concordance with previous studies showing active ingredient efficacy decreases with increasing irrigation level, especially above 8 mm (Vieira and Sumner 1999), where some have suggested that the mechanism is related to an inverse relationship between irrigation level and deposition efficiency of the fungicide onto foliage (Geary et al., 2004).

Fungicides can influence yield and formation of sclerotia. Procymidone showed lower sclerotia development than fluazinam in 2013 and 2014 (Table 4). Venegas and Saad (2010) showed chemigation resulted in the best disease control, fewer apothecia and lower

weight of residual sclerotia in harvest. Another study applied both procymidone and fluazinam and showed treatments reduced the number of sclerotia by up to one tenth of the control (Botelho and Costa, 1997). Interaction of increasing irrigation level and plant health and productivity should also be considered. For example, despite of lower concentration of fungicide in 10.0 mm of water level, yield was highest in this treatment, likely due to lower overall disease pressure in 2014 and increased water (20 mm in two applications) that promoted production (Table 4). However, differences in yield with respect to water level were not significant and not evidenced in previous research. For example, work by Vieira et al. (2001) showed yield of soybean with conventional application of fluazinam was not different from treatments applied via irrigation.

Somewhat unexpected were results showing fluazinam and procymidone in most cases followed a similar rate of decay in white mold disease suppression and showed no difference in terms of cumulative lesion area (Table 3). Since procymidone is able to be absorbed through plant roots and translocate to leaves (Chen et al. 2010), we expected disease control with fluazinam to decrease more rapidly and procymidone to be more sustained. Our results showed differences in rate of disease control over time were more similar between fungicides in the same year than year-to-year within fungicides (Table 3), suggesting the mode of action did not affect longevity of disease control ability with respect to *S. sclerotiorum* infection. Similar results were observed comparing cumulative lesion development (AUDPC; Table 3). Collectively, these results suggest disease control ability of a systemic fungicide (procymidone) was similar to a contact fungicide (fluazinam). However, it is important to consider that these results are based on leaves harvested from the upper plant canopy, whereas leaves from the lower or inner canopy may have shown differences due to greater dependence of contact fungicides on canopy penetration for effectiveness. Although others have reported that fluazinam can control

white mold when applied directly to soil, where fluazinam was superior to benomyl (systemic) in reducing incidence and severity when applied only to soil (Vieira et al 2003), these fungicides are not presently labeled for direct soil application. Additional research is needed to fully characterize the effect of fungicide application via irrigation on development of sclerotia, where no previous studies have examined their effect on apothecial development, which may be more indicative of disease control ability. In addition, future work should examine residual fungicide activity in the lower and inner plant canopy, where systemic fungicides may play a more vital role in disease control.

ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledged is financial support provided to T. J. J. Miorini by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES with a PhD scholarship. The authors also thank Cercadinho Farm and Agricultural Research and Development Center (CPDA) for access to research plots. Financial support for research also provided by Arysta LifeScience. Special thanks to those assisted with the project, including Ângelo Stasievski, Dorival Boer Júnior, Luiz Henrique Almeida Silva, and Jhonatan Cavalieri.

LITERATURE CITED

- Abawi, G. S., Polach, F. J., and Molin, W. T. 1975. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathol.* 65:673-678.
- Augusto, J., and Brenneman, T. B. 2012. Assessing systemicity of peanut fungicides through bioassay of plant tissues with *Sclerotium rolfsii*. *Plant Dis.* 96:330-337.
- Bardin, S. D., and Huang, H. C. 2001. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 88-98.
- Bezerra, A.M.E. Produtividade e qualidade das sementes de feijão de corda em diferentes colheitas. 1992. 103f. Dissertação.(Mestrado em Fitotecnia) . Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Boland, G. J., and Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16:93-108.
- Bolton, M. D., Thomma, B.P.H.J., and Nelson, B.D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 7:1-16.
- Botelho, S. A., and Costa, J. L. S. Efeito da dosagem e número de aplicações de fungicidas via pivô central para o controle do mofo branco do feijoeiro. In: Congresso Brasileiro De Fitopatologia, 30, Poços de Caldas, 1997. Abstract p. 252.
- Bradley, C. A., Lamey, H. A., Endres, G. J., Henson, R. A., Hanson, B. K., Mckay, K. R., Halvorson, M., Legare, D.G., and Porter, P. M. 2006. Efficacy of fungicides for control of Sclerotinia stem rot of canola. *Plant Dis.* 90:1129-1134.
- Bruhn, J. A., and Fry, W. E. 1982. A statistical model of fungicide deposition on potato foliage. *Phytopathol.* 72:1301-1305.

- Butzler, T. M., Bailey, J. E., and Beute, M. K. 1998. Integrated management of Sclerotinia blight in peanut: Utilizing canopy morphology, mechanical pruning, and fungicide timing. *Plant Dis.* 82:1312-1318.
- Chen, L., Li, X-S., Wang, Z-Q., Pan, C-P., and Jin, R-C. 2010. Residue dynamics of procymidone in leeks and soil in greenhouses by smoke generator application. *Ecotox. Environ. Safe.* 73:73-77.
- Conab. 2015. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 2 – safra 2014/15, n. 8 – oitavo levantamento. Online publication. www.conab.gov.br
- Cunha, J. P. A. R., Teixeira, M. M., Vieira, R. F., and Barbosa, L. C. A. 2001. Eficácia do fungicida epoxiconazol aplicado via pivô central no feijoeiro. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient* 5:450-455.
- Ferrel, M. A. 2002. Effect of water pH on the chemical stability of pesticides. University of Wyoming Pesticide Education Program Fact Sheet Mp-February 2002.
- Geary, B., Hamm, P. B., and Johnson, D. A. 2004. Deposition and redistribution of fungicides applied by air and chemigation for control of late blight in commercial potato fields. *Amer. J. Potato Research*, 81:305-315.
- Guimarães, C. M., Stone, L. F., and Brunini, O. 2006. Adaptação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. *Revista Bras. de Engenharia Agríc. e Ambiental*, 10:70–75.
- Guo, Z., Miyoshi, H., Komyoji, T., Haga, T., and Fujita, T. 1991. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chlo-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. *Biochim. Biophys. Acta* 1056:89-92.
- Hamm P. B., and Clough, G. H. 1999. Comparison of application methods on deposition and redistribution of chlorothalonil in a potato canopy, and potential impact for control of late blight. *Plant Dis* 83:441-444.

- Harikrishnan, R., and del Río, L. E. 2006. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. *Plant Dis.* 90:946-950.
- Johnson D. A., Cummings, T. F., and Hamm, P. B. 2000. Cost of fungicides used to manage potato late blight in the Columbia Basin: 1996 to 1998. *Plant Dis.* 84:399-402.
- Kim, H. S., Hartman, G. L., Manandhar, J. B., Graef, G. L., Steadman, J. R., and Diers, B. W. 2000. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Sci.* 40:665-669.
- Kull, L. S., Vuong, T. D., Powers, K. S., Eskridge, K. M., Steadman, J. S., and Hartman, G. L. 2003. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. *Plant Dis.* 87:1471-1476.
- Kull, L. S., Pedersen, W. L., Palmquist, D., and Hartman, G. L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 88:325-332.
- Lehner, M. S., Paula Júnior, T. J., Silva, R. A., Vieira, R. F., Carneiro, J. E. S., Schnabel, G., and Mizubuti, E. S. G. 2015. Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: a thorough assessment using discriminatory dose, EC₅₀, high-resolution meting analysis, and description of new point mutation associated with thiophanate-methyl resistance. *Plant Dis.* 99 (11):1537-1543.
- Lemay, A. V., Bailey, J. E., and Shew, B. B. 2002. Resistance of peanut to *Sclerotinia* blight and the effect of acibenzolar-S-methyl and fluazinam on disease incidence. *Plant Dis.* 86:1315-1317.
- Leone, G., and Tonneijck, A. E. G. 1990. A rapid procedure for screening the resistance of bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica* 48:87-90.

- Lethan, D. B., Huett, D. O., and Trimboli, D. S. 1976. Biology and control of *Sclerotinia sclerotiorum* in cauliflower and tomato crops in coastal New South Wales. *Plant Dis. Rep.* 60:286–289.
- Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 24:853-863.
- Ma, H. X., Chen, Y., Wang, J. X., Yu, W. Y., Tang, Z. H. Chen, C. J., and Zhou, M. G. 2009. Activity of carbendazim, dimethachlon, iprodione, procymidone and boscalid against *Sclerotinia* stem rot in Jiangsu Province of China. *Phytoparasitica* 37:421-429.
- Mahoney, K. J., McCreary, C. M., and Gillard, C. L. 2014. Response of dry bean white mould [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causal organism] to fungicides. *Can. J. Plant Sci.* 94:905-910.
- Matherom, M. E., and Porchas, M. 2004. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Dis.* 88:665-668.
- Miklas, P. N., Porter, L. D., Kelly, J. D., and Myers, J. R. 2013. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. *Eur. J. Plant Pathol.* 135:525-543.
- Morton, J. G., and Hall, R. 1989. Factors determining the efficacy of chemical control of white mold in white bean. *Can. J. Plant Pathol.* 11:297-302.
- Mueller, D. S., Dorrance, A.E., Derksen, R. C., Ozkan, E., Kurle, J. E., Grau, C.R., Gaska, J. M., Hartman, G. L., Bradley, C. A., and Pedersen, W. L. 2002. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potencial for control of sclerotinia stem rot on soybean. *Plant Dis.* 86:26-31.

- Paula Júnior, T. J., Vieira, R. F., Teixeira, H., and Carneiro, J. E. S. 2009a. Foliar application of calcium chloride and calcium silicate decreases white mold intensity on dry beans. *Trop. Plant Pathol.* 34:171-174.
- Paula Júnior, T. J., Vieira, R. F., Rocha, P. R. R., Bernardes, A., Costa, E. L., Carneiro, J. E. S., Vale, F. X. R., and Zambolim, L. 2009b. Intensidade do mofo-branco em feijão em função de densidade de plantas, frequência de irrigação, cobertura vegetal do solo, *Trichoderma* spp. e fungicida. *Summa Phytopathol.* 35:44-48.
- Paula Júnior, T. J., Teixeira, H., Vieira, R. F., Morandi, M. A. B., Lehner, M. S., Lima, R. C., and Carneiro, J. E. S. 2012. Limitations in controlling white mold on common beans with *Trichoderma* spp. at the fall-winter season. *Summa Phytopathol.* 38:337-340.
- Pinto, N. F. J. A., and Costa, E. F. 1999. Aplicação de fungicidas via água de irrigação para o controle da ferrugem-do-feijoeiro-comum. *Pesq. Agrop. Bras.* 34:317-321
- Shaner, G., and Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathol.* 67:1051-1056.
- Tolentino Junior, J. B., Rezende, R., Itako, A. T., Freitas, P. S. L., and Frizzone, J. A. 2011. Drip fungigation in early blight control of tomato. *Acta Sci. Agron.* 33:9-14.
- Venegas, F., and Saad, J. C. C. 2010. Fungigação no controle do mofo branco e produtividade do feijoeiro em condições de cerrado brasileiro. *Irriga* 15:159-172.
- Vieira, R. F., and Sumner, D. R. 1999. Application of fungicides to foliage through overhead sprinkler irrigation – a review. *Pest. Sci.* 55:412-422.
- Vieira, R. F., Paula Júnior, T. J., Carneiro, J. E. S., Teixeira, H., and Queiroz, T. F. N. 2012. Management of white mold in type III common bean with plant spacing and fungicide. *Trop. Plant Pathol.* 37:95-101.

- Vieira, R. F., Paula Júnior, T. J., Peres, A. P., and Machado, J. C. 2001. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. *Fitopatologia Brasileira* 26:770-773.
- Vieira, R. F., Paula Júnior, T. J., Teixeira, H., and Carneiro, J. E. de S. 2010. White mold management in common bean by increasing within-row distance between plants. *Plant Dis.* 94:361-367.
- Vieira, R. F., Pinto, C. M. F., and Paula Junior, T. J. 2003. Chemigation with benomyl and fluazinam and their fungicidal effects in soil for white mold control on dry beans. *Fitopatologia Brasileira* 28:245-250.
- Vitoratos, A. G. 2014. Mode of action and genetic analysis of resistance to fluazinam in *Ustilago maydis*. *J. Phytopathol.* 162:737-746.

TABLES

Table 1. Linear regression analysis of percent white mold control by fluazinam in a bioassay following different chemigation levels, by conventional application, and with up to three applications at the Itaí field site in 2013 and Pereiras field site in 2013 and 2014, with corresponding area under disease progress curve (AUDPC) for each treatment.

Site	Application	Irrigation level	Linear regression			Test statistic (p-value)		AUDPC lesion area
			Slope	Intercept	R-squared	Day	Treatment	
Itaí-2013	First	2.5 mm	-6.33	92.9	0.75	<0.0001	0.7007	25.62 B*
		5.1 mm	-6.47	80.3	0.7			34.02 AB
		10.1 mm	-6.84	81.0	0.93			35.26 A
Pereiras-2013	First	3.0 mm	-10.11	123.2	0.86	<0.0001	0.2507	14.38
		4.5 mm	-9.91	117.5	0.96			15.95
		6.0 mm	-9.91	116.0	0.75			16.68
	Second	3.0 mm	-5.64	117.9	0.63	<0.0001	0.9278	4.85 B
		4.5 mm	-6.30	116.2	0.77			7.64 B
		6.0 mm	-10.73	127	0.86			14.26 A
	Third	3.0 mm	-1.97	94.6	0.96	0.018	0.6645	6.00
		4.5 mm	-0.53	83.7	0.07			6.50
		6.0 mm	-1.29	81.8	0.18			9.12
Pereiras-2014	First	2.5 mm	-6.68	109	0.87	<0.0001	0.0254	65.80 C
		5.0 mm	-5.25	89.7	0.73			77.53 BC
		7.5 mm	-3.94	68.3	0.59			88.88 B
		10.0 mm	-3.36	53	0.51			104.84 A
	conventional	-5.71	111.2	0.76	<0.0001	0.0113	48.78 D	
	Second	2.5 mm	-2.1	94.6	0.66	<0.0001	0.8877	27.64 AB
		5.0 mm	-2.24	101.7	0.56			21.30 B
		7.5 mm	-2.31	100.5	0.58			24.59 B
		10.0 mm	-3.27	95.7	0.75			40.66 A
conventional		-1.1	92.6	0.28	<0.0001			0.8962

* Treatments with the same letters within each application are not significantly different based on Tukey test ($\alpha=0.05$)

Table 2. Linear regression analysis of percent white mold control by procymidone in bioassay following different chemigation levels, by conventional application, and with up to two applications at Pereiras field site in 2013 and 2014, with corresponding area under disease progress curve (AUDPC) for each treatment.

Site	Application	Irrigation level	Linear regression			Test statistic (p-value)		AUDPC lesion area
			Slope	Intercept	R-squared	Day	Treatment	
Pereiras-2013	First	3.0 mm	-8.51	111.8	0.98	<0.0001	0.2507	15.20 B*
		4.5 mm	-7.76	85.2	0.85			25.33 A
		6.0 mm	-7.35	82.8	0.73			25.25 A
	Second	3.0 mm	-8.19	115.7	0.95	<0.0001	0.9278	13.01
		4.5 mm	-9.85	118.4	0.96			15.93
		6.0 mm	-7.87	108.3	0.99			15.73
	Third	3.0 mm	-3.10	87.3	0.38	0.018	0.6645	11.47
		4.5 mm	-2.38	86.2	0.35			10.33
		6.0 mm	-0.37	70.1	0.03			11.81
Pereiras-2014	First	2.5 mm	-5.74	106.3	0.93	<0.0001	0.0475	60.68 B
		5.0 mm	-6.21	95.7	0.91			82.01 A
		7.5 mm	-5.31	88.4	0.93			79.95 A
		10.0 mm	-5.01	77	0.89			93.01 A
		conventional	-6	114.7	0.93			<0.0001
	Second	2.5 mm	-0.65	95.5	0.13	0.004	0.9901	13.45 CD
		5.0 mm	-0.98	92.5	0.13			20.07 BC
		7.5 mm	-1.98	95.5	0.42			28.91 AB
		10.0 mm	-2.49	97	0.47			32.10 A
	conventional	-0.16	93.5	0.02	0.0033	0.9968	9.97 D	

* Treatments with the same letters within each application are not significantly different based on Tukey test ($\alpha=0.05$)

Table 3. Difference in average rate of decay in white mold control and cumulative lesion areas between years and fungicides.

	Fluazinam		Procymidone	
	First	Second	First	Second
Between years				
Rate of decay with $R^2 > 0.70$	4.01	5.25 ^ψ	2.31*	-
AUDPC	23.95*	2.22	13.20	4.07
	2013		2014	
Between fungicides	First	Second	First	Second
Rate of decay with $R^2 > 0.70$	2.10*	0.12	0.40	-
AUDPC	6.26	5.97	4.49	0.32

* designates comparisons that were significant based on a t-test ($p < 0.05$)

^ψ comparisons not possible due to small sample size

Table 4. Comparison of fungicide treatments and irrigation levels on number of *S. sclerotiorum* sclerotia in soil, weight of residual sclerotia (g) in 28 m², disease incidence (%), and yield (kg ha⁻¹) in Pereiras, SP.

Pereiras-2013		Number of sclerotia	Weight of sclerotia	Disease incidence	Yield (kg ha⁻¹)
Control vs treatments ²		** ¹	**	**	**
Control		27.3 A	16.5 A	71.3 A	1,273.8 B
Treatments		8.7 B	6.9 B	16.9 B	2,387.0 A
Fungicide		**	**	**	**
Fluazinam	3.0 mm	10.5	11.1	27.5 a	2,297.4
	4.5 mm	13.5	9.6	16.3 b	2,188.4
	6.0 mm	18.5	10.7	20.0 ab	2,108.2
	Average	14.2 A	10.47 A	21.3 A	2,198.0 B
Procymidone	3.0 mm	4.3	3.8	10.0 b	2,606.2
	4.5 mm	3.8	3.6	10.0 b	2,512.4
	6.0 mm	1.8	2.7	17.5 a	2,609.4
	Average	3.3 B	3.38 B	12.5 B	2,576.0 A
Pereiras-2014					
Control vs treatments ²		** ¹	**	**	**
Control		8.0 A	5.9 A	6.6 A	2,649.0 B
Treatments		0.8 B	1.1 B	1.0 B	3,182.9 A
Fungicide		Ns	**	ns	*
Fluazinam	2.5 mm	0.8	2.1	0.9	3,285.6
	5.0 mm	0.3	1.8	0.9	3,207.8
	7.5 mm	0.8	2.3	1.1	3,218.0
	10.0 mm	1.3	2.0	1.9	3,447.7
	Conventional	1.3	1.2	0.3	3,219.2
	Average	0.9	1.9 A	1.0	3,275.7 A
Procymidone	2.5 mm	0	0.2	0.8	2,695.4 b
	5.0 mm	0.5	0.2	0.6	3,129.4 ab
	7.5 mm	1.5	0.4	1.5	3,248.4 ab
	10.0 mm	0.8	0.8	1.6	3,373.2 a
	Conventional	1.0	0.3	0.3	3,004.2 ab
	Average	0.8	0.4 B	1.0	3,090.1 B

¹** ($\alpha = 0.01$); * ($\alpha = 0.05$); ns (not significant). ²Control vs treatments = interaction between control versus all treatments. Averages followed by different uppercase letter within each variable and for significant fungicides, besides the control vs treatment) and different lowercase letter within each variable for each fungicide differed based on Tukey test ($\alpha=0.05$).

FIGURES

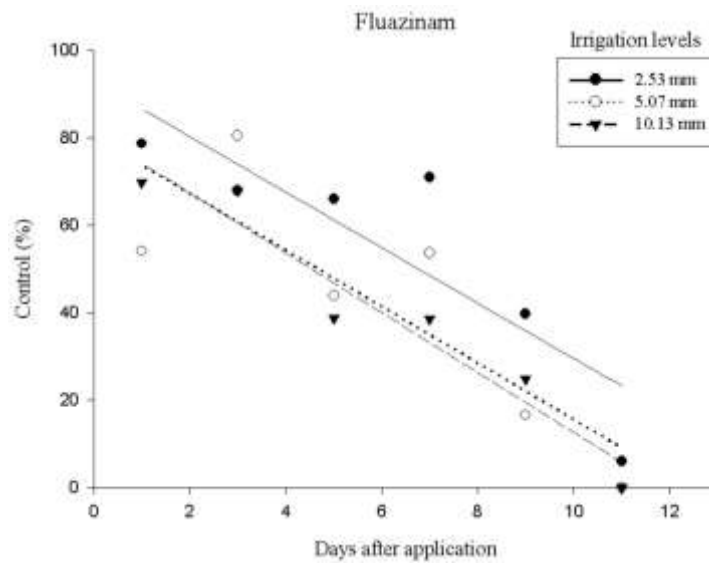


Figure 1. White mold disease control in a bioassay with dry common bean under fluazinam treatment applied in a single application at three chemigation levels (2.53, 5.07, and 10.13 mm) at the Itaf field site in 2013; lines are fitted linear regression.

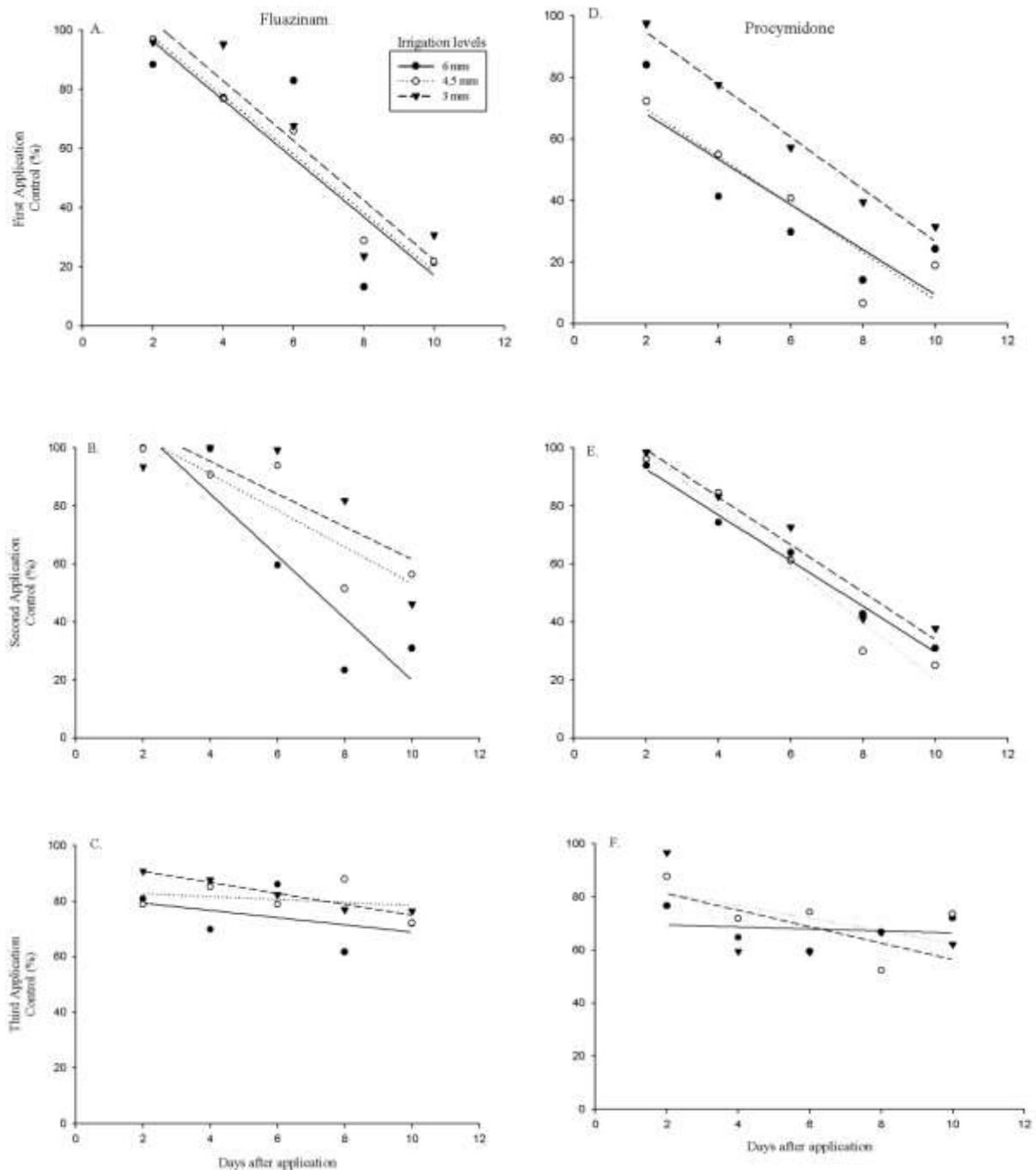


Figure 2. White mold disease control in a bioassay with dry common bean under fluazinam (left) and procymidone (right) treatment applied at three chemigation levels (3.0, 4.5, and 6.0 mm) in three successive applications (top, middle, lower) at the Pereiras field site in 2013; lines are fitted linear regression.

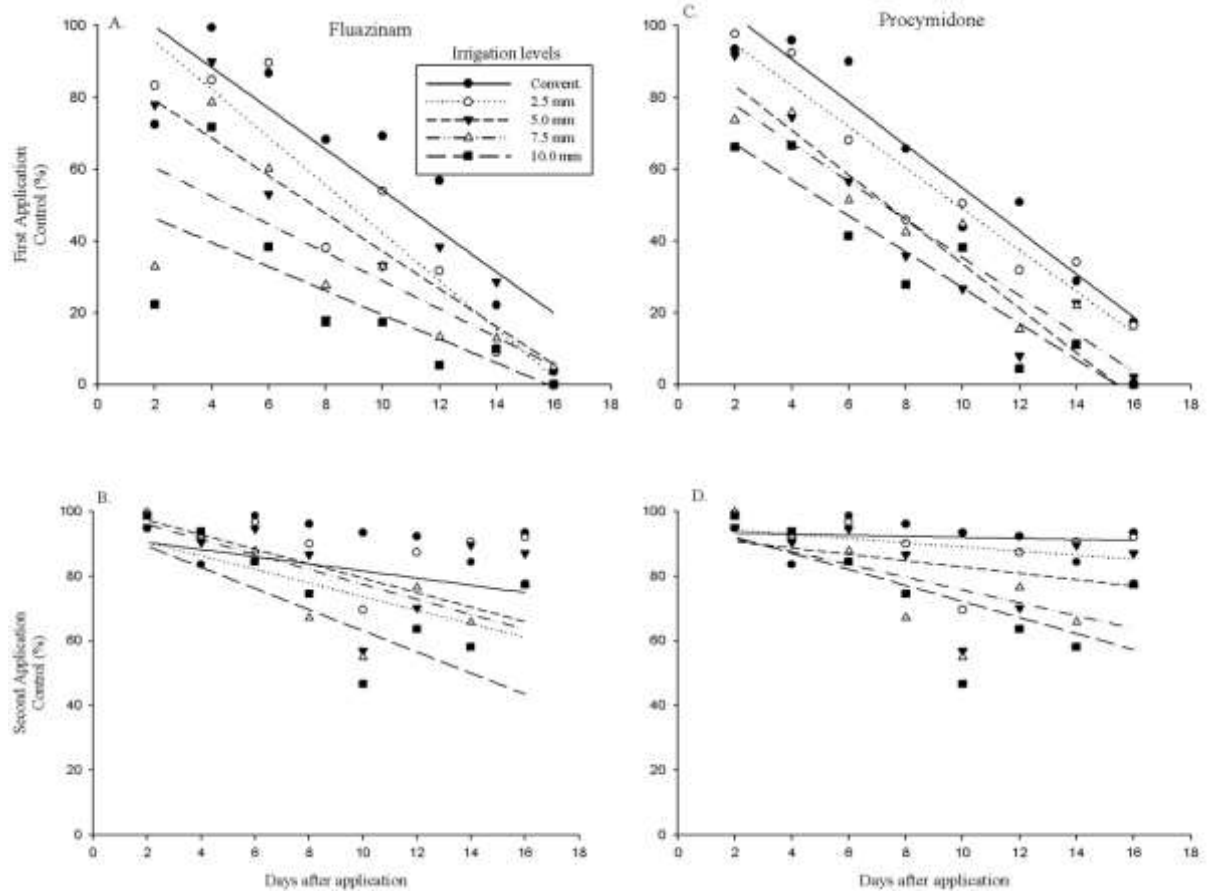


Figure 3. White mold disease control in bioassay with dry common bean under fluaznam (left) and procymidone (right) treatment applied at four chemigation levels (2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 mm) and by conventional airblast application, in two successive applications (top, lower) at the Pereiras field site in 2014; lines are fitted linear regression.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do *Detached leaf assay* (DLA) mostrou-se um método adequado para avaliar e acompanhar a atividade residual de diferentes ingredientes ativos, em diferentes lâminas d'água (fungigação) quando aplicadas sob forma de pulverização convencional. Apesar da infecção primária de plantas de feijoeiro ser causada por ascósporos que colonizam as flores (ABAWI; GROGAN, 1975), infecções secundárias podem também ocorrer em folhas, pecíolos e ramos pelo contato direto das flores infectadas com os tecidos adjacentes das plantas. O procedimento de inoculação utilizado nesse estudo com discos do meio de cultura contendo micélio do patógeno foi similar a infecção natural resultante do contato direto das partes das plantas de soja ou feijão com o patógeno. Portanto, o controle da taxa de crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum* pelo DLA evidencia a viabilidade desse método para avaliação de fungicidas no controle da infecção secundária, inibindo assim a disseminação da doença.

O DLA utilizado nos experimentos foi similar aos métodos anteriormente utilizados para estudos de resistência da *S. sclerotiorum* para soja e feijão (KIM et al., 2000; KULL et al., 2003; KULL et al., 2004). Mueller et al. (2002) utilizaram o DLA para avaliar a eficiência dos fungicidas (benomyl, tebuconazol, tiofanato metílico e vinclozolin), em folhas de soja coletadas um dia após a pulverização, e verificaram que o

tiofanato metílico e o vinclozolin preveniram em 100% a colonização do fungo *S. sclerotiorum* na folha destacada.

No primeiro experimento, conduzido em casa-de-vegetação simulando a quimigação as folhas para condução do DLA só foram coletadas 13 dias após a primeira aplicação e 4 dias após a segunda aplicação. Nos demais experimentos à campo, as folhas foram coletadas a cada dois dias para acompanhar a atividade do ingrediente ativo ao longo do tempo.

Durante a aplicação dos tratamentos, as folhas que seriam destacadas futuramente, não foram previamente marcadas. Assim, nos dias das coletas, as folhas destacadas já haviam sido pulverizadas com fungicida. Para produtos sistêmicos como o procimidona, o ingrediente ativo continua sendo transportado pelos vasos do xilema da planta, atingindo as folhas novas. Mas para produtos de contato, aquela folha destacada provavelmente não possuía o ingrediente ativo. Logo, em trabalhos futuros, seria interessante marcar as folhas a serem coletadas antecedendo as pulverizações, confirmando assim, que estas folhas haviam sido pulverizadas. Esse fato é bastante relevante principalmente para produtos fitossanitários considerados com modo de ação por contato.

Os experimentos realizados na cultura da soja evidenciaram que o fungicida fluazinam (produto de contato) reduziu sua atividade residual mais rapidamente que o procimidona (produto sistêmico), demonstrando que os diferentes fungicidas possuem efeitos distintos quanto o período residual do ingrediente ativo. Essa discrepância para o tempo de atividade residual entre os fungicidas não foi observado do mesmo modo para o feijoeiro. No feijoeiro, pequenas modificações foram notadas, mas não como observado na soja. Essa tendência de diminuição rápida do período residual do ingrediente ativo fluazinam na soja, pode ter ocorrido pelo fato da soja ser semeada em um período quente e com uso de irrigação quando necessário o que levou ao desenvolvimento vegetativo rápido e lançamento de novas folhas em um curto período de tempo. Os experimentos com feijoeiro foram conduzidos em épocas mais amenas e o lançamento de novas folhas era mais lento. Evidenciando novamente a necessidade de marcar as folhas antecedendo a pulverização, principalmente em culturas semeadas em período quente e quando se utiliza produtos com modo de ação por contato.

Trabalhos futuros deveriam avaliar a interação entre diferentes cultivares de feijoeiro e de soja com os fungicidas usados no controle do mofo-branco. E,

com isso, propor estratégias de manejo do patógeno considerando a variabilidade genética da cultura e os produtos fitossanitários em uso.

Além de avaliar a eficácia e o período residual de fungicidas no controle do mofo-branco, o DLA pode ser utilizado em experimentos futuros para avaliar novos ingredientes ativos lançados no mercado no controle do patógeno. Testes preliminares sugerem que alguns fungicidas apresentaram um pequeno efeito supressivo sobre a *S. sclerotiorum*, mas nada comparado ao controle que os fungicidas registrados no MAPA (fluazinam e procimidona, por exemplo) exercem sobre o patógeno.

O fungo *S. sclerotiorum* é considerado um patógeno de natureza polífaga, abrangendo 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras (BOLTON et al., 2006). Por este motivo, o DLA pode ser utilizado para avaliar a eficiência e o período residual de fungicidas no controle do mofo-branco em outras culturas que são acometidas pelo fungo *S. sclerotiorum*, culturas estas em que é possível destacar as folhas, manter em ambiente controlado e inocular o fungo.

O DLA mostrou-se mais adequado para o propósito de investigar a atividade residual fungicida quando comparado ao *straw test*. Apesar do *straw test* ter apresentado a tendência da atividade residual fungicida ser menor quanto mais espaçado o intervalo entre a aplicação do fungicida e a inoculação do fungo, este método pode ser utilizado somente em casa-de-vegetação pois as plantas são cortadas entre o 4º e 5º nó e inoculadas com o fungo caracterizando um teste destrutivo de difícil execução no campo.

Para quantificar a concentração (mg kg^{-1}) de três fungicidas (procimidona, fluazinam e carbendazim) realizou-se a coleta de folhas em diferentes dias após a aplicação e a extração seguiu a metodologia de Quechers, técnica esta que ganhou significativa popularidade desde seu desenvolvimento e publicação (WILKOWKA; BIZIUK, 2011). As taxas de decréscimo na concentração dos fungicidas foram calculadas para os três ingredientes ativos e verificou-se que o fluazinam diminui mais rapidamente a concentração do ingrediente ativo, seguido dos fungicidas procimidona e do carbendazim.

A idéia inicial para utilização da metodologia de Quenchers foi comparar simultaneamente a concentração dos três ingredientes ativos com os resultados da área lesionada obtida pelo DLA de folhas coletadas ao mesmo tempo. Infelizmente, o fungo inoculado nas folhas coletadas para condução do DLA, visando avaliar indiretamente a atividade residual dos fungicidas, não se desenvolveu satisfatoriamente como em experimentos anteriores, mesmo no tratamento sem aplicação de fungicidas.

Portanto, a comparação direta entre a concentração do ingrediente ativo e a área lesionada nas folhas não foi possível. Entretanto, observou-se a mesma tendência da atividade residual do fungicida fluazinam na cromatografia e em outros experimentos em que a soja foi pulverizada com fluazinam e foi possível a condução do DLA. Pela cromatografia (HPLC) observou-se decréscimo da concentração do fungicida fluazinam em mais de 50% já no segundo dia após a pulverização, o que mostra certa similaridade com o DLA, em que os tratamentos com fluazinam resultaram em decréscimo rápido da atividade residual do ingrediente ativo, fato observado indiretamente pela maior área lesionada nas folhas coletadas.

O DLA também poderia ser utilizado para avaliação do efeito de adjuvantes sobre a atividade residual fungicida no controle de *S. sclerotiorum*, bem como do efeito de chuvas sobre o tempo da atividade residual de ingredientes ativos no controle do mofo-branco.

4 CONCLUSÕES

- *Detached leaf assay* pode ser utilizado para avaliar, indiretamente, a atividade residual dos fungicidas;
- *Detached leaf assay* pode ser utilizado para avaliar a eficiência de outros fungicidas sobre o mofo-branco, sejam fungicidas utilizados para controle de outras doenças na cultura da soja e do feijão ou novos fungicidas que possam ter algum efeito sobre o mofo-branco.
- A metodologia Quencher pode ser utilizada para avaliação da concentração de fungicidas em folhas de soja e, os fungicidas apresentam diferenças nas taxas de decréscimo da concentração do ingrediente ativo na planta, com decréscimo mais rápido para o fluazinam, seguido pelo procimidona e carbendazim;
- Aplicações em diferentes fases do desenvolvimento do feijoeiro e da soja têm efeitos diferenciados na atividade residual;
- O uso de óleo mineral associado a fungicidas pode influenciar de maneira negativa (fluazinam) ou positiva (procimidona) no período residual após a segunda pulverização para o controle do mofo-branco;
- A atividade residual do fungicida fluazinam diminui mais rapidamente na cultura da soja que na cultura do feijoeiro;
- Os diferentes fungicidas possuem períodos distintos sobre o período residual no feijoeiro, porém esta distinção é melhor evidenciada na cultura da soja.

- Fungigações diminuem mais rapidamente a atividade residual do fungicida quando comparado com aplicações sob forma de pulverização, e esta redução é mais pronunciada em lâminas d'água maiores;
- A produtividade do feijoeiro é influenciada de maneira positiva pela aplicação de fungicidas no controle do mofo-branco, com diferenças entre os fungicidas, porém com resultados divergentes entre as safras.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 65, p. 300–309, 1975.

ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 896-899, 1979.

ADAMS, P. B. Factors affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Plant Disease Reporter**, v. 59, n. 7, p. 599-603, 1975.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 5 de out. 2015.

AIDAR, H. et al. Sistema de produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais: época de plantio. Santo Antonio de Goiás EMBRAPA, 2002. (Circular técnica, 55). Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/CNPAF/publicação/circular_técnica/ct_55/index.htm>.

ALEXOPOULOS, C. J.; MINIS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1996. 868p.

ALLEN, D. J. **The pathology of tropical food legumes: disease resistance in crop improvement**. Chichester: Wiley, 1983.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M., MEYER, M. C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMTI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4.ed. São Paulo. Agronômica Ceres Ltda, v.2. 2005.

- ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C.D.S.S. (Ed.). **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 399p.
- ALVARENGA, D. O. ; QUEIROZ, P. R.; ALMEIDA, A. M.; MELLO, S. C. M. **Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 24p.
- ARYSTA LIFESCIENCE, **Ficha de informações de segurança de produto químico – Legacy**. Disponível em: <http://www.arystalifescience.com.br/arysta/upload/arysta/129797759661450016_FISPQLegacy.pdf>. Acesso em 18 de janeiro de 2016a.
- ARYSTA LIFESCIENCE, **Ficha de informações de segurança de produto químico – Sumiguard 500 WP**. Disponível em: <<http://www.arysta.com.br/arquivos/7ccffb4e3c006ea1b026704222237733.pdf>>. Acesso em 18 de janeiro de 2016b.
- ATALLAH, Z. K.; JOHNSON, D. A. Development of *Sclerotinia* stem rot in potato fields in south-central Washington. **Plant Disease**, v. 88, n.4, p. 419-423, 2004.
- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 21-24, 2007.
- BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa. v. 23, p. 88-98. 2001.
- BASANTA, M. D. V.; DOURADO NETO, D.; GARCIA, A. G. Y. Estimativa do volume máximo de calda para aplicação foliar de produtos químicos na cultura de milho. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 283-288, 2000.
- BECKMAN, K. M.; PARSONS, J. E. Fungicidal control of *Sclerotinia* wilt in green beans. **Plant Disease Reporter**, v. 49, n. 4, p. 357-358, 1965.
- BEDI, K. S. The age and size of the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in relation to the formation of apothecia. **Journal of Indian Botanical Society**, v. 42, p. 204-207, 1963.
- BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 411-451, 1986.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico**. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1996.
- BLAD, B. L.; STEADMAN, J. R.; WEISS, A. Canopy structure and irrigation influence white mold disease and microclimate of dry edible beans. **Phytopathology**. v. 68, p. 1431-1437, 1978.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ontario. **Phytopathology**, v. 78, n. 9, p.1241-1245, 1988.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BOTELHO, S. A.; COSTA, J. L.S. Efeito da dosagem e número de aplicações de fungicidas via pivô central para o controle do mofo branco do feijoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30, Poços de Caldas, 1997. **Resumos**. p. 252.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 31 de ago. 2015.

BUTZLER, T. M.; BAILEY, J. E.; BEUTE, M. K. Integrated management of *Sclerotinia* blight in peanut: Utilizing canopy morphology, mechanical pruning, and fungicide timing. **Plant Disease**, v. 82, n. 12, p. 1312-1318, 1998.

CAMPOS, H. D.; SILVA, L. H. C. P.; CABRAL, D. A. C.; SILVA, J. R. C.; RIBEIRO, G. C.; SILVA, R. S. Eficácia de Fungicidas para Controle de Mofo branco na Cultura da Soja na Safra 2010/2011, Montividiu – GO. In: **Resumos Expandidos XXXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. Cap. 42, p. 151-153.

CAMPOS, H. D.; SILVA, L. H. C. P.; MEYER, M. C.; SILVA, J. R. C.; NUNES JUNIOR, J. Mofo-branco na cultura da soja e os desafios da pesquisa no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, Suplemento, p. C-CI, 2010.

CARDOSO, S. S. et al. Eficiência de fungicidas no controle do mofo branco na cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 14, n. 1, p. 49-52, 2015.

CARREGAL, L. H.; CAMPOS, H. D.; SILVA, J. R. C. **Saiba mais sobre Mofo branco**. 2005. Disponível em: < <http://www.ihara.com.br/index/ebsite.asp?ID=2065>>. Acesso em: out. 2015.

CHAVES, G. M. **Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**. 1961. 79f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1961.

CHEN, C.-J.; YU, J.-J.; BI, C.-W.; ZHANG, Y.-N.; XU, J.-Q.; WANG, J.-X.; ZHOU, M.-G. 2009. Mutations in a β -tubulin confer resistance of *Gibberella zeae* to benzimidazole fungicides. **Phytopathology**, v. 99, n. 12, p. 1403- 1411, 2009.

CHEN, L.; LI, X.; WANG, Z.; PAN, C.; JIN, R. Residues dynamics of procymidone in leeks and soil in greenhouses by smoke generator application. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 73-77, 2010.

CLARKSON, J. P.; STAVELEY, J.; PHELPS, K.; YOUNG, C. S.; WHIPPS, J. M. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, v. 107, n. 2, p. 213–222, 2003.

COLEY-SMITH, J. R.; COOKE, R. C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, p. 65-92, 1971.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 2 – safra 2014/15, n. 8 – oitavo levantamento, mai. 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: jun. 2015.

CORDEIRO, L. G. et al. Fator de sensibilidade ao déficit hídrico da cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp.). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 2, n. 2, p. 153-157, 1998.

CUNHA et al. Eficácia do fungicida epoxiconazol aplicado via pivô central no feijoeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 5, n. 3, p. 450-455, 2001.

DAVIDSE, L. C. 1986. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. *Annual Review Phytopathology*, v. 24, p. 43-65, 1986.

DEL RÍO, L. E.; MARTINSON, C. A.; YANG, X. B. Biological Control of Sclerotinia stem rot of soybean with *Sporidesmium sclerotivorum*. *Plant Disease*, v. 86, n. 9, p. 999-1004, 2002.

DEL RÍO, L. E.; VENETTE, J. R.; LAMEY, H. A. Impact of white mold incidence on dry bean yield under nonirrigated conditions. *Plant Disease*, v. 88, n. 12, p. 1352–1356, 2004.

DORRANCE, A. E.; MILLS, D. **Sclerotinia stem rot (white mold) of soybean**. The Ohio State University, 2008. Disponível em: <http://ohioline.osu.edu/ac-fact/pdf/AC_45_08.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2015.

ETHUR, L.Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 30, p. 127-133, 2005.

FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da Soja no Brasil**. Londrina: Embrapa-CNPSO, 1979. 42p.

FURLAN, S. H. **Guia de identificação de doenças do feijoeiro**. Campinas: Instituto Biológico, 2012. 109 p.

GABRIELSON, R. L.; GUILFORD, R. K.; COAHRAN, D. R. Field control of white mold and gray molds of beans in western Washington. *Plant Disease Reporter*, v. 55, p. 234-238, 1971.

GEARY, B.; HAMM, P. B.; JOHNSON, D. A. Deposition and redistribution of fungicides applied by air and chemigation for control of late blight in commercial potato fields. *American Journal of Potato Research*, v. 81, p. 305-315, 2004.

GENT, D. H.; SCHWARTZ, H. F.; NISSEN, S. J. Effect of commercial adjuvants on vegetable crop fungicide coverage, absorption, and efficacy. *Plant Disease*, v. 87, n. 5, p. 591-597, 2003.

GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: EMBRAPA AGROPECUARIA OESTE, 2005. 72p.

GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD-FILHO, D. S. Inhibitory potencial of extracts from 11 plants to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bipolaris* spp. **XLII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**. Tropical Plant Pathology. Rio de Janeiro, 2009.

GRABICOSKI, E. M.; JACCOUD-FILHO, D. S.; PILEGGI, M. HENNEBERG, L.; VRISMAN, C. M.; PIERRE, M. L. C.; SARTORI, F. F. Estudos preliminares de detecção Molecular de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. In: **XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES**. ABRANTES, Natal, 2011.

GRAU, C. R. *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. IN: WYLLIE, T. D.; SCOTT, D. H. **Soybean Diseases of the North Central Region**. United States of America: The American Phytopathological Society, 1988. p. 56-66.

GRAU, D. R. *Sclerotinia* Stem Rot. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. Compendium of Soybean Diseases. 3 ed. **APS Press**, 1989. p.47-48.

GRAU, C.R.; HARTMAN, G. L. *Sclerotinia* Stem Rot. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. 4 ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 46-48.

GRAU, C. R.; RADKE, V. L. Effectes of cultivars and cultural practices on *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Plant Disease**, v. 68, n. 1, p. 56-58, 1984.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalats production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3703-3711, 2004

GUO, Z.; MIYOSHI, H.; KOMYOJI, T.; HAGA, T.; FUJITA, T. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chlo-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1056, n. 1, p. 89-92, 1991.

HAO, J. J.; SUBBARAO, K. V.; DUNIWAY, J. N. Germination of the *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. **Phytopathology**, v. 93, n.4, p. 443-450, 2003.

HANCOCK, J. C. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. **Phytopathology**, v. 56, p. 975-979, 1966.

HARIKRISHNAN, R.; DEL RÍO, L. E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers white mold development. **The American Phytopathological Society**. v. 90, n. 7, p. 946-950, 2006.

HARTMAN, G. L.; KULL, L. S.; HUANG, Y. H. Occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean fields in east-central Illinois and enumeration of inocula in soybean seed lots. **Plant Disease**, v. 82, n. 5, p. 560-564, 1998.

HART, S. E.; KELLS, J. J.; PENNER, D. Influence of adjuvants on the efficacy, absorption, and spray retention of rimsulfuron. **Weed Technoogy**, v. 6, n. 3, p. 592-598, 1992.

- HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**, v. 37, p. 447–471, 1999.
- HIGHLAND, H. B.; WALGENBACH, P. Serenade MAX, a biofungicide for use against *Sclerotinia* spp. white mold diseases in vegetable and canola crops. In: **14th INTERNACIONAL SCLEROTINIA WORKSHOP**. Wilmington: (s.n.), 2009. Poster Session. p.27.
- HOFFMAN, D. D.; HARTMAN, G. L.; MUELLER, D. M.; LEITZ, R. A.; NICKELL, C. D.; PEDERSEN, W. L. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 82, n. 7, p. 826–829. 1998.
- HUNTER, J. E.; ABAWI, G. S.; CROSIER, D. C. Effects of timing, coverage, and spray oil on control of white mold of snap bean with benomyl. **Plant Disease Reporter**, v. 62, n. 7, p. 633-637, 1978.
- JONES, S. J.; GENT, D. H.; PETHYBRIDGE, S. J.; HAY, F. S. Spatial characteristics of white mould epidemics and the development of sequential sampling plans in Australian bean fields. **Plant Pathology**, v. 60, n. 6, p. 1169–1182, 2011.
- JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C. **Manejo integrado de doenças na cultura da soja**. 1 ed. Uberlândia: (s.n.), 2004. 327 p.
- JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F.C. **Podridão branca da haste de soja: Manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção**. Uberlândia: Composer, 2010. 33p.
- KERR, E. D.; SMITH, A. C.; YONTS, C. D.; WILSON, R. G. 1992. Fungicide efficacy for bean white mold under different plant populations and row spacings. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v. 35, p.52-53, 1992.
- KIM, H. S.; HARTMAN, G. L.; MANANDHAR, J. B.; GRAEF, G. L.; STEADMAN, J. R.; DIERS, B. W. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. **Crop Science**, v. 40, p. 665-669, 2000.
- KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 158-164, 2001.
- KOHN, L. M. A monographic review of the genus *Sclerotinia*. **Mycotaxonomy**, v. 9, n. 2, p. 365-444, 1979.
- KUDISK, P.; MATHIASSEN, S. K.; KIRKNEL, E. Influence of formulations and adjuvants on the rainfastness of maneb and mancozeb on pea and potato. **Pesticide Science**, v. 33, n. 1, p. 57-71, 1991.
- KULL, L. S.; VUONG, T. D.; POWERS, K. S.; ESKRIDGE, K. M.; STEADMAN, J. S.; HARTMAN, G. L. 2003. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, v. 87, n. 12, p. 1471-1476, 2003.

- KULL, L. S.; PEDERSEN, W. L.; PALMQUIST, D.; HARTMAN, G. L. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. v. 88, n. 4, p. 325-332, 2004.
- LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005, p.1-3 (Comunicado Técnico, 76).
- LEHNER, M. S.; PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, R. A.; VIEIRA, R. F., CARNEIRO, J. E. S.; SCHNABEL, G.; MIZUBUTI, E. S. G. Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: a thorough assessment using discriminatory dose, EC50, high-resolution meting analysis, and description of new point mutation associated with thiophanate-methyl resistance. **Plant Disease**, v. 99, n. 11, p. 1537-1543 , 2015.
- LEMAY, A. V.; BAILEY, J. E.; SHEW, B. B. Resistance of peanut to *Sclerotinia* blight and the effect of acibenzolar-S-methyl and fluazinam on disease incidence. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1315-1317, 2002.
- LI, Y. B.; YONGLI, Z.; NIAN, L. B. Study on the dissemination distance of sunflower stem rot fungus. **Plant Protection**. v. 20, p. 12–13, 1994.
- LI, Y.; KIM, M. R.; LEE, K. B.; KIM, I. S.; SHIM, J. H. Determination of procymidone residues in ginseng by GC-ECD and GC-MS equipped with a solvent-free solid injector. **Food Control**. v. 18, p. 364-368, 2007.
- LUMSDEN, R. D. *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulase. **Phytopathology**, v. 59, n. 5, p. 653–657, 1969.
- LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, p. 890–896, 1979.
- LUMSDEN, R. D.; DOW, R. L. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. **Phytopathology**, v. 63, p. 708–715, 1973.
- MACBEAN, C. (ed) **The pesticide manual**. 16^a ed. Alton: British Crop Production Council, UK, 2012, 1439 p.
- MAHONEY, K. J.; MCCREARY, C. M.; GILLARD, C. L. Response of dry bean white mould [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causal organism] to fungicides. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, n. 5, p. 905-910, 2014.
- MANANDHAR, J. B.; KULL, L. S.; PEDERSEN, W. L.; HARTMAN, G. L. Aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates and evaluation of soybeans for resistance to *Sclerotinia* stem rot. (Abstr.) **Phytopathology**, v. 88, p. 57, 1998.
- MARCUCCI, R.; ALEANDRI, M. P.; CHILOSI, G.; MAGRO, P. Induced resistance by β -aminobutyric acid in artichoke against white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.158, n. 10, p. 659-667, 2010.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Org.). **Manual de Fitopatologia: volume I – Princípios e Conceitos**. 4 ed. Ceres: São Paulo, 2011, v.1, p. 149-206.

MATHEROM, M. E.; PORCHAS, M. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. **Plant Disease**, v. 88, n. 6, p. 665-668, 2004.

MA, Z.; MICHAILEDIS, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 853-863, 2005.

MELO, I. S.; FAULL, J. L.; NASCIMENTO, R. S. Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p.417-419, 2006

MENTEN, J. O. M.; LIMA, L. C. S. F.; FRARE, V. C.; RABALHO, A. A. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. IN: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, DFP, 2005, cap. 12, p. 333-374.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D. Guerra ao mofo. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 120, ano 11, p. 16-18. 2009.

MEYER et al., **Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2013/2014** – resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015, p.1 – 4 (Circular Técnica, 109).

MEYER, M. C.; GODOY, C. V.; CAMPOS, H. D. **Lucro mofado**. Cultivar Grandes Culturas, Pelotas, v. 15, n. 181, p. 22-24, 2014.

MEYER, M.C.; NUNES JUNIOR, J.; PIMENTA, C.B; SEIL, A.H.; NUNES SOBRINHO, J.B.; COSTA, N.B.; GY+UARNIERI, S.F. Eficiência de fungicidas no controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, no estado de Goiás. In: **Resumos Expandidos XXXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. cap.41. p. 148-150.

MIKLAS, P. N.; PORTER, L. D.; KELLY, J. D.; MYERS, J. R. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, n. 3, p. 525-543, 2013.

MIORINI, T. J. J.; SAAD, J. C. C.; MENEGALE, M. L. Supressão de água em diferentes fases fenológicas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Irriga**, Botucatu, v. 16, n.4, p. 360-368, 2011.

MOLLOY, C.; CHEAH, L. H.; KOOLAARD, J. P. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, n.1, p. 61-65, 2004.

MORTON, J. G.; HALL, R. Factors determining the efficacy of chemical control of white mold in white bean. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 11, n. 3, p. 297–302, 1989.

MUELLER, D. S.; BRADLEY, C. A.; GRAU, C. R.; GASKA, J. M.; KURLE, J. E.; PEDERSON, W. L. Application of thiophanate-methyl at different host growth stages for management of sclerotinia stem rot in soybean. **Crop Protection**. v.23, n. 10, p. 983-988, 2004.

MUELLER, D. S.; DORRANCE, A.E.; DERKSEN, R. C.; OZKAN, E.; KURLE, J. E.; GRAU, C.R.; GASKA, J. M.; HARTMAN, G. L.; BRADLEY, C. A.; PEDERSEN, W. L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of sclerotinia stem rot on soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 1, p. 26-31, 2002.

MUELLER, D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, v. 83, n. 12, p. 1113–1115, 1999.

NAPOLEÃO, R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; NASSER, L. C. B.; LOPES, C. A.; SILVA, H.R. Intensidade do mofo-branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 374-379, 2005.

NATTI, J. J. Epidemiology and control of bean white mold. **Phytopathology**, v. 61 n. 6, p. 669-674, 1971.

NIEDEBALKI, J. F.; RICKARD, S. F. Sclerotinia white mold control in snap and lima beans with 2,6-dichlor-4-nitroaniline. **Plant Disease Reporter**, v. 53, n. 7, p. 573-575, 1969.

NÓBREGA, J. Q. et al. Análise de crescimento do feijoeiro submetido a quatro níveis de umidade do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Ambiental**, Campina Grande, v. 5, n. 3, p. 437-443, 2001.

OLIVEIRA, S. H. F.; RECCO, C. A.; SUGAHARA, E.; OLIVEIRA, D. A. Avaliação comparativa da fungigação e aplicação convencional de fungicidas para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 21, n. 3-4, p. 249-252, 1995.

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 8-13, 2005.

OLIVEIRA, Z.B. **Perdas de água e variações na temperatura de um argissolo vermelho em função de diferentes quantidades de resíduos vegetais na superfície e espaçamento entre linhas do feijoeiro**. Santa Maria, 2011. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria. 2011.

OTTO-HANSON, L.; STEADMAN, J. R.; HIGGINS, R.; ESKRIDGE, K. M. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. **Plant Disease**, v. 95, n. 11, p. 1370-1376, 2011.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; JÚNIOR, M. L., MORANDI, M. A. B., CARNEIRO, J. E. S. Mofo-Branco. In: PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Cultura do Feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: UEPG, 2010. p.101-299.

PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H.; VIEIRA, R. F.; MORANDI, M. A. B.; LEHNER, M. S.; LIMA, R. C.; CARNEIRO, J. E. S. Limitations in controlling white mold on common beans with *Trichoderma* spp. at the fall-winter season. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 337-340, 2012.

PHILLIPS, A. J. L. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytophylactica**, v. 19, p. 279-283, 1987.

PINTO, N. F. J. A. Fungigação e nematigação. In: COSTA, E.F.; VIEIRA, R.F.; VIANA, P.A. (Eds.). Quimigação: aplicação de produtos químicos e biológicos via irrigação. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.229-248.

PINTO, N. F. J. A.; COSTA, E. F. Aplicação de fungicidas via água de irrigação por aspersão para o controle da ferrugem-do-feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 317-321, fev. 1999.

PRATT, R. G.; ROWE, D. E. Differential responses of alfalfa genotypes to stem inoculations with *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. **Plant Disease**, v. 75, n. 2, p. 188-191, 1991.

QUELLO, K. L.; CHAPMAN, K. S.; BECKERMAN, J. L. In situ detection of benzimidazole resistance in field isolates of *Venturia inaequalis* in Indiana. **Plant Disease**, v. 94, n. 6, p. 744-750, 2010.

REDDY, K. N.; LOCKE, M. A. Imazaquin spray retention, foliar washoff and runoff losses under simulated rainfall. **Pesticide Science**, v. 48, p.179-187, 1996.

REZENDE, A. A.; JULIATTI, F. C.; CAIRES, A. M.; AGUIAR, P. CARNEIRO, L. M. S. Eficiência de diferentes produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. no controle da podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: **Resumos XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. cap.71. p. 229-232.

RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FÈVRE, M. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1478-1484, 1991.

SAHARAN, G. S.; MEHTA, N. **Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management**. Índia: Springer, 2008. 486p.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta (UFPR)**, v.30, n. ½, p. 129-137, 2000.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Factors affecting sclerotium populations of and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.68, p.383-388, 1978.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. White mold. In: SCHWARTZ, H. F.; M. A. PASTOR-CORRALES, M. A. (Eds.), **Bean production problems in the tropics**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 211-230, 1989.

SCHWARTZ, H. F.; HARVESON, R. M.; STEADMAN, J. R. **White mold of Dry Beans**. Crop Series/Diseases: Colorado State University Extension, p. 1-3, mai. 2011. (Fact sheet nº 2918).

- SEAB. Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná. Disponível em: <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp>>. Acesso em: out. 2015.
- SILVEIRA, P. M. da; STONE, L. F. Irrigação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 74-82, 2004.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199–2223, 2010.
- STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e o controle alternativo de doenças de plantas. **Biotecnologia Ciência; Desenvolvimento**, Brasília, v. 11, p. 16-21, 1999.
- STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 904-907, 1979.
- SUN, P.; YANG, X. B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, n. 12, p. 1287–1293, 2000.
- SUTTON, D. C.; DEVERALL, B. J. Studies on infection of bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**. v. 32, p. 251–261, 1983.
- SWAMINATHAN, J.; MCLEAN, K. L.; PAY, J. M.; STEWART, V. Soil solarisation: A cultural practice to reduce viability of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in New Zealand soils. **New Zealand Journal Crop and Horticultural Science**, v.27, n. 4, p.331-335, 1999.
- TECNOLOGIAS de produção de soja** – região central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p. (Embrapa Soja. Sistemas de produção, 16).
- TOLENTINO JUNIOR, J. B.; REZENDE, R.; ITAKO, A. T.; FREITAS, P. S. L.; FRIZZONE, J. A. Drip fungigation in early blight control of tomato. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 9-14, 2011.
- TOMLIN, C. D. S. **The pesticide manual** – a world compendium. Surrey, UK: British Crop Protection Council. 13 ed., 2003. p. 136-138, 446-447, 804-803, 973-974.
- TU, J.C. Epidemiology of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in navy bean (*Phaseolus vulgaris*). **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, v. 52, n. 3, p. 787-796, 1987.
- TU, J.C. Management of white mold of white beans in Ontario. **Plant Disease**, v. 73, n. 4, p. 281-285, 1989.
- VARNER, G. White mold control programs on irrigated dry beans. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v. 29, p. 56-57, 1986.
- VENEGAS, F.; SAAD, J. C. C. Fungigação no controle do mofo branco e produtividade do feijoeiro em condições de cerrado brasileiro. **Irriga**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 159-172, 2010.

- VIEIRA, R. F.; SUMNER, D. R. Application of fungicides to foliage through overhead sprinkler irrigation – a review. **Pesticide Science**, v. 55, p. 412-422, 1999.
- VIEIRA, R. F.; PINTO, C. M. F.; PAULA JUNIOR, T. J. Chemigation with benomyl and fluazinam and their fungicidal effects in soil for white mold control on dry beans. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 245-250, 2003.
- VIEIRA, R. F. Introdução à quimigação. In: COSTA, E. F., VIEIRA, R. F., VIANA, P. A. **Quimigação: aplicação de produtos químicos e biológicos via irrigação**. Brasília: Embrapa, SPI, 1994. p.13-40.
- VIEIRA, R. F. et al. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n.4, p. 770-773, 2001.
- VIEIRA, R. F.; PAULA JÚNIOR, T. J.; CARNEIRO, J. E. S.; TEIXEIRA, H.; QUEIROZ, T. F. N. Management of white mold in type III common bean with plant spacing and fungicide. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 95-101, 2012.
- VIEIRA, R. F.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H.; CARNEIRO, J. E. de S. White mold management in common bean by increasing within-row distance between plants. **Plant Disease**, v. 94, n. 3, p. 361-367, 2010.
- VITORATOS, A. G. Mode of action and genetic analysis of resistance to fluazinam in *Ustilago maydis*. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 11-12, p.737-746, 2014.
- WEGULO, S. N.; SUN, P.; MARTINSON, C. A.; YANG, X. B. Spread of *Sclerotinia* stem rot of soybean from area and point sources of apothecial inoculum. **Canadian Journal of Plant Science**. v. 80, n. 2, p. 389–402, 2000.
- WILKOWSKA, A., BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**. v. 125, p. 803-812, 2011.
- WONG, F. P.; DE LA CERDA, K. A.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; MIDLAND, S. L. Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. **Plant Disease**, v. 92, n. 2, p. 239-246, 2008.
- WU, B. M.; SUBBARAO, K. V.; LIU, Y.-B. Comparative survival of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 98, n. 6, p. 659-665, 2008.
- YORINORI, J. T.; CHARCHAR, M. J. D.; NASSER, L. C. B.; HENNING, A. A. Doenças da Soja e Controle. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M. **Cultura da soja nos Cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 334-397.
- ZENG, W.; HAO, J. Efficacy of *Coniothyrium minitans* on controlling *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. In: **14th International Sclerotinia Workshop**. Wilmington: (s.n.), 2009. Session 13, p.12.