

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

SUZANY SANTOS DE MOURA

**MONITORAMENTO POR AEROBIOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DA
RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS EM *Phakopsora pachyrhizi*, O PATÓGENO DA
FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

Ilha Solteira - SP
2024



SUZANY SANTOS DE MOURA

**MONITORAMENTO POR AEROBIOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DA
RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS EM *Phakopsora pachyrhizi*, O PATÓGENO DA
FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Área de Concentração: Produção vegetal

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ceresini

Coorientadores: Prof. Dr. Silvino Intra Moreira
e Prof. Dr. Paulo Eduardo Teodoro

Ilha Solteira - SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Moura, Suzany Santos de.

M929m Monitoramento por aerobiologia e estratégias de manejo da resistência a fungicidas em *Phakopsora pachyrhizi*, o patógeno da ferrugem asiática da soja / Suzany Santos de Moura. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024
71 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistema de Produção, 2024

Orientador: Paulo César Ceresini

Co-orientador: Silvino Intra Moreira Paulo Eduardo Teodoro

Co-orientador: Paulo Eduardo Teodoro

Inclui bibliografia

1. Estratégias inteligentes anti-resistência. 2. Controle químico. 3. Patógeno fúngico foliar. 4. *Glycine max*.


Amanda Sertori dos Santos

Bibliotecária - CRB/8-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao
Usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: MONITORAMENTO POR AEROBIOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DA RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS EM PHAKOPSORA PACHYRHIZI, O PATÓGENO DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

AUTORA: SUZANY SANTOS DE MOURA

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

COORIENTADOR: SILVINO INTRA MOREIRA

COORIENTADOR: PAULO EDUARDO TEODORO

**Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia, área:
Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI (Participação Presencial)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO (Participação Presencial)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Profa. Dra. MARIA CÂNDIDA DE GODOY GASPAROTO (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP

Dr. FELIPE RAFAEL GARCES FIALLOS (Participação Virtual)
Facultad de Ingeniería Agronómica / Universidad Técnica de Manabí - UTM (Equador)

Dr. FABIANO JOSÉ PERINA (Participação Virtual)
Núcleo de Pesquisa do Cerrado / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Ilha Solteira, 29 de fevereiro de 2024

**FELIPE
RAFAEL
GARCES
FIALLOS**
Firmado digitalmente por
FELIPE RAFAEL
GARCES FIALLOS
Fecha:
2024.02.29
09:06:28 -0500'

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO
Data: 29/02/2024 21:43:44-0300
Verifique em <https://validar.it6.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANO JOSÉ PERINA
Data: 29/02/2024 11:40:59-0300
Verifique em <https://validar.it6.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA CÂNDIDA DE GODOY GASPAROTO
Data: 29/02/2024 12:13:58-0300
Verifique em <https://validar.it6.gov.br>

Dedico este trabalho à minha família que amo muito.

Vocês são minha base, meu âmagô.

Com carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela força e coragem durante toda a caminhada, me sustentado em momentos de dificuldades.

Ao meu companheiro Weyller, por me proporcionar paz, estabilidade emocional e deixar meu coração “quentinho”. Pelo carinho, incentivo e empenho a mim dedicado, agradeço.

Aos meus pais Sra. Cidelina e Sr. Sebastião, pelo amor, compreensão e apoio nos momentos de incertezas, me ensinando a ter persistência no meu caminho até o objetivo, dando-me coragem para descobrir realidades e novas possibilidades.

A minha família pelo amor, carinho, apoio, incentivo e empenho dedicado a mim, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam, e, nenhuma conquista valeria a pena.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo César Ceresini pela sapiência compartilhada, incentivo e orientações.

Aos professores pelos ensinamentos, e colaboradores da Pós-graduação que sempre estavam prontos a me auxiliar.

Aos meus amigos da Fundação Chapadão pelo fornecimento de dados de safras passadas, por ceder o espaço para a realização deste trabalho e fornecer mão de obra para me ajudar nas tarefas da pesquisa. Sem eles a elaboração do mesmo teria sido árdua e difícil.

Aos meus colegas da UNESP que me ajudaram na realização dessa pesquisa. Em especial, Abimael e Loane.

À “turma do cafezinho”, pela descontração, conversas alegres e pelo convívio.

As pessoas com quem convivi ao longo desses anos, por acrescentarem muitas experiências em minha vida. Quero expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que de forma direta ou indiretamente, contribuíram para que o doutorado tornasse realidade.

Agradeço a Coordenadoria de Ações Afirmativas, Diversidade e Equidade (CA-ADI) pela concessão da bolsa, que tornou possível minha participação nas atividades do laboratório de Fitopatologia Molecular da Unesp – FEIS.).

“O segredo do sucesso é a constância do propósito” (Benjamin Disraeli)

RESUMO

Phakopsora pachyrhizi é o fungo causador da ferrugem asiática da soja, a doença mais severa da cultura, causando perdas significativas na produção. O controle químico acontece em larga escala com fungicidas sítio-específicos, dentre os quais: DMI (triazóis), Qol (estrobilurinas) e SDHI (carboxamidas de segunda geração). Esse fungo é altamente adaptável às estratégias de controle, e devido à resistência do patógeno a esses fungicidas a redução na eficácia de controle da ferrugem é percebida safra após safra. Esses fungicidas apresentam de médio a alto risco para o surgimento de resistência, pois são usados intensivamente e isoladamente. Para a obtenção de conhecimento sobre a ocorrência e prevalência de resistência do fungo *P.pachyrhizi* aos fungicidas dos grupos DMI, Qol e SDHI em Mato Grosso do Sul (MS), buscou-se no primeiro capítulo identificar a evolução da resistência do fungo a fungicidas DMIs e aos Qols em uma série de dados de onze safras (2009/10 a 2020/21) coletadas na Fundação Chapadão na microrregião sojícola de Chapadão do Sul/MS, por meio da análise de tendência com o teste não-paramétrico Mann-Kendall ($\alpha = 0,05$). O segundo capítulo aborda uma estratégia anti-resistência eficaz e de baixo custo, por meio do monitoramento da população do patógeno pelo coletor de esporos modelo SIGA, que possibilitou a identificação de inóculo na área de cultivo. Somado a isso, a resistência do fungo a fungicidas SDHI foi verificada por meio de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), a partir das amostras de aerossóis adquiridas pelo coletor no período de outubro de 2020 a janeiro de 2022. O grupo DMI não apresentou redução de eficácia ao longo das safras. Por outro lado, houve tendência à prevalência de resistência para o grupo Qol provavelmente devido à estabilidade da resistência mesmo na ausência de fungicida, caracterizando uma mutação irreversível. Foi detectado e quantificada a prevalência relativa do alelo selvagem (I86) do gene *sdhC* de *P. pachyrhizi* selvagem e mutante (86F) que confere sensibilidade ou resistência aos fungicidas SDHI, no período de safra e no pousio, indicando flutuação alélica ao longo do tempo analisado. Para a ferrugem Asiática da soja, o monitoramento de aerossóis, por meio da aerobiologia com coletores simplificados e análise por PCR em tempo real, foi útil na detecção e quantificação de esporos de *P.pachyrhizi* com alelo selvagem (I86) ou mutante (86F) do gene *sdhC*, que confere resistência ao grupo químico SDHI.

Palavras-chave: estratégias inteligentes anti-resistência; controle químico; patógeno fúngico foliar; *Glycine max*.

ABSTRACT

Phakopsora pachyrhizi is the fungus that causes Asian soybean rust, the most severe disease in the crop, causing significant yield losses. Chemical control occurs on a large scale with site-specific fungicides, including: DMI (triazoles), QoI (strobilurins) and SDHI (second generation carboxamides). This fungus is highly adaptable to control strategies, and due to the pathogen's resistance to these fungicides, the decrease in the efficacy of rust control is noticed season after season. These fungicides present a medium to high risk for the emergence of resistance as if they are used intensively and alone. To obtain knowledge about the occurrence and prevalence of resistance of the fungus *P. pachyrhizi* to fungicides from the DMI, QoI and SDHI groups in Mato Grosso do Sul, the first chapter sought to identify the evolution of the fungus' resistance to DMIs fungicides and QoIs in a series of data of eleven harvests (2009/10 to 2020/21) collected at Fundação Chapadão in the soybean microregion of Chapadão do Sul/MS, through trend analysis with the non-parametric Mann-Kendall test ($\alpha = 0.05$). The second chapter addresses an effective and low-cost anti-resistance strategy, through monitoring the pathogen population using the SIGA model spore collector, which made it possible to identify the inoculum in the cultivation area. In addition, the resistance of the fungus to SDHI fungicides was verified using real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), based on aerosol samples acquired by the collector from October 2020 to January 2022. The group DMI did not show a reduction in effectiveness throughout the harvests. On the other hand, there was a tendency towards the prevalence of resistance to the QoI fungicides probably due to the stability of resistance in the absence of the fungicides, characterizing an irreversible mutation. Wild-type (I86) and mutant (86F) alleles of *P. pachyrhizi*, which confers sensitivity or resistance to the SDHI fungicides, was detected and quantified, during the harvest period and fallow, indicating allelic fluctuation over the time analyzed. For Asian soybean rust, aerosol monitoring, through aerobiology with simplified collectors and real-time PCR analysis, was useful in detecting and quantifying spores of *P. pachyrhizi* with wild-type (I86) as well mutant allele (86F) of the *sdhC* gene, which confers resistance to SDHI fungicides.

Keywords: smart anti-resistance strategies; chemical control; foliar fungal pathogen; *Glycine max*.

SUMÁRIO

1	ANÁLISE TEMPORAL DA RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS EM FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA EM CHAPADÃO DO SUL, MS	12
1.1	INTRODUÇÃO	14
1.2	MATERIAL E MÉTODOS	17
1.2.1	Campo experimental e tratamentos	17
1.2.2	Avaliação da doença e obtenção dos dados climáticos	18
1.2.3	Análise estatística	20
1.2.4	Índices de favorabilidade climática ao desenvolvimento da doença ..	21
1.3	RESULTADOS	22
1.3.1	Eficácia dos grupos químicos triazol (DMI) e estrobilurinas (QoI) nas safras	22
1.3.2	Comportamento da Ferrugem nas safras	23
1.3.3	Índice de favorabilidade climática ao desenvolvimento da doença ..	24
1.4	DISCUSSÃO	25
1.4.1	Eficácia dos grupos químicos triazol (DMI) e estrobilurinas (QoI) nas safras	25
1.4.2	Comportamento da ferrugem nas safras	29
1.4.3	Índice de favorabilidade climática ao desenvolvimento da doença ..	31
1.5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34
2	AEROBIOLOGIA DO PATÓGENO DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA: MONITORAMENTO DE INÓCULO E DETECÇÃO DE ALELO DE RESISTÊNCIA (<i>SDHC</i> -186F) A FUNGICIDA.....	40
2.1	INTRODUÇÃO	42
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	45
2.2.1	Monitoramento da dispersão aérea de esporos	45
2.2.2	Extração de DNA fúngico de amostras de esporos transportados pelo ar	46
2.2.3	PCR em tempo real (RT qPCR) para detecção de alelos do gene <i>sdhC</i> de <i>P. pachyrhizi</i>	48

2.2.4	Representação descritiva de séries temporais e análises estatísticas	50
2.3	RESULTADOS.....	51
2.3.1	Detecção de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em amostras de aerobiologia usando RT qPCR	51
2.4	DISCUSSÃO	57
2.5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE.....	69

1 ANÁLISE TEMPORAL DA RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS EM FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA EM CHAPADÃO DO SUL, MS

RESUMO

Phakopsora pachyrhizi é o fungo causador da doença foliar mais severa da soja brasileira. O controle químico acontece em larga escala com fungicidas sítio-específicos, dentre os quais: DMI (triazóis) e Qol (estrobilurinas). A redução no controle dessa doença com estes fungicidas é percebida safra após safra devido a resistência do patógeno a estes fungicidas. O objetivo deste trabalho foi identificar a tendência de resistência do fungo *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas DMIs e aos Qols em uma série de dados de onze safras na microrregião sojícola de Chapadão do Sul/MS, e ainda, compreender o comportamento do fungo ano após ano. Para tanto, com os dados de safras (2009/10 a 2020/21) foram realizadas análise de tendência para resistência da *P. pachyrhizi* aos grupos DMIs e Qols. O grupo DMI não apresentou redução de eficácia ao longo das safras. Por outro lado, para o grupo Qol, houve tendência à resistência. A aptidão competitiva do fungo *P. pachyrhizi* pode ter promovido a ausência de tendência para resistência ao triazol. A tendência de resistência do fungo ao Qol, ocorre devido a estabilidade e frequência de isolados mutados mesmo na ausência de fungicida. Esse tipo de resistência não pode ser reversível ou minimizada.

Palavras-chave: *Glycine max*; Série temporal; Resistência fúngica; Eficácia de fungicidas pertencentes aos grupos DMIs e Qols.

TEMPORAL ANALYSIS IN THE ASIAN SOYBEAN RUST RESISTANCE TO FUNGICIDES IN CHAPADÃO DO SUL, MS

ABSTRACT

Phakopsora pachyrhizi is the fungus that causes the most severe foliar disease of Brazilian soybeans. Chemical control occurs on a large scale with site-specific fungicides, including: DMI (triazoles) and QoI (strobilurins). The reduction in control of this disease with these fungicides is noticed crop after crop due to the pathogen's resistance to these fungicides. The objective of this work was to identify the resistance trend of the fungus *Phakopsora pachyrhizi* to DMI fungicides and QoIs in a series of data from eleven harvests in the soybean microregion of Chapadão do Sul/MS, and also to understand the behavior of the fungus year after year. To this end, using harvest data (2009/10 to 2020/21), trend analysis was carried out for *P. pachyrhizi* resistance to the DMIs and QoIs groups. The DMI group did not show a reduction in efficacy throughout the harvests. On the other hand, for the QoI group, there was a tendency towards resistance. The competitive ability of the fungus *P. pachyrhizi* may have promoted the absence of a tendency towards triazole resistance. The trend towards resistance of the fungus to QoI occurs due to the stability and frequency of mutated isolates even in the absence of fungicide. This type of resistance cannot be reversible or minimized.

Keywords: *Glycine max*; Time series; Fungal resistance; Efficacy of fungicides belonging to the DMIs and QoIs groups.

1.1 INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., é considerada a doença mais severa na cultura da soja brasileira (Ribeiro *et al.*, 2016) reduzindo a produtividade em até 80% na ocorrência de surtos epidêmicos (EMBRAPA, 2013). Além da perda direta, essa doença compromete a qualidade do produto final, em consequência da desfolha precoce que influencia na formação, no enchimento de vagens e peso final do grão (Moura, 2018).

A ferrugem ocorre em todos os países produtores de soja no mundo, mas é na América do Sul que ocasiona os maiores danos à produção, em função da grande área de soja cultivada, e da prevalência de condições climáticas ideais ao desenvolvimento do fungo durante todo o ano (Li *et al.*, 2010; Henning *et al.*, 2014). No Brasil, o primeiro relato oficial do fitopatógeno foi em 2001 (Yorinori *et al.*, 2021), e atualmente está presente na maioria dos estados brasileiros produtores de soja (Consórcio Antiferrugem, 2024).

A capacidade do fungo *P. pachyrhizi* em se conectar entre áreas ocorre devido à dispersão aérea dos esporos em longa distância a partir de uma área de origem (Li *et al.*, 2010). Na existência de hospedeiro adequado, o fungo *P. pachyrhizi* pode sobreviver e produzir uredósporos durante todo o ano, favorecendo a ocorrência da doença na safra da soja (Hartman *et al.*, 2015). Aliado a isso, temperaturas entre 18 e 26 °C, umidade relativa entre 75% e 80%, água livre na superfície do limbo foliar, são fatores favoráveis às infecções e ao desenvolvimento da doença, tornando-a mais destrutiva nessas condições (Sikora *et al.*, 2014; Nunes; Martins; Pontes, 2018).

Uma das estratégias para a diminuição do inóculo da ferrugem é o vazio sanitário, que consiste na eliminação do principal hospedeiro, a soja, nos Estados em que seu cultivo pode ser realizado durante todo o ano (Godoy *et al.*, 2020). Desta forma, foi instituído que a soja deve ser cultivada por determinados períodos do ano, e a pausa fitossanitária ocorre por um período de 90 dias sem a presença de soja viva e plantas voluntárias nas lavouras (Brasil, 2022).

Outra técnica para o manejo da ferrugem é o controle químico utilizando fungicidas. Esse método ocorre em larga escala por ser a principal forma de controle dessa doença (Nascimento, 2018), e devido a extensa área geográfica cultivada com a soja no Brasil, 45.088,6 mil ha (CONAB, 2024). Os principais grupos químicos de fungicidas sítio-específicos utilizados pertence aos inibidores da desmetilação (DMI,

“triazóis”), inibidores de quinona externa (QoI, “estrobilurinas”) e inibidores da enzima succinato desidrogenase (ISDH, “carboxamidas”), que atuam contra um único ponto da via metabólica de um patógeno ou contra uma única enzima ou proteína (Godoy *et al.*, 2020). Outros fungicidas multissítios sintéticos ou biológicos também são incorporados no controle e são utilizados normalmente, com a finalidade de retardar ou evitar a seleção de biótipos resistentes aos fungicidas sítio-específicos (Godoy *et al.*, 2021).

As aplicações com fungicidas, normalmente são realizadas preventivamente, seguindo critérios como a presença da doença na região, condições ambientais favoráveis e ocorrência da ferrugem nas áreas de produção (Godoy *et al.*, 2017). Contudo, o excessivo número de aplicações de fungicidas tem aumentado a seleção de indivíduos resistentes aos produtos de sítio-específicos (Ishii; Holloman, 2015), tendo em vista que a resistência de um fungo ao fungicida é a resposta natural dos fungos a uma ameaça externa à sua sobrevivência, obtida através de processos evolutivos (Godoy *et al.*, 2020).

Isolados de *P. pachyrhizi* menos sensíveis aos DMIs foram observadas em lavouras brasileiras na safra 2007/08 e na safra 2013/14 foi constatado a redução de eficácia no controle do fungo para fungicidas QoIs (EMBRAPA, 2015). Por isso, o posicionamento atual são aplicações de fungicidas sítio-específico em mistura com fungicidas multissítios na cultura da soja, com o intuito de recuperar a baixa eficácia dos produtos que já apresentam redução da sensibilidade, preservar a vida efetiva dos princípios ativos utilizados e aumentar a eficiência de controle (Juliatti; Belotti; Juliatti, 2014; Godoy *et al.*, 2020).

Atualmente existem 211 fungicidas comerciais registrados para o controle da *P. pachyrhizi* na cultura da soja (MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Brasil. AGROFIT - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários, 2024). Apesar desse número elevado de fungicidas comerciais registrados, a maioria é formada pela combinação de ingredientes ativos sítio-específicos, fungicidas iguais (mesmo fungicida com nome comercial diferente) e fungicidas genéricos (produtos com o mesmo princípio ativo), muitos deles com reconhecida eficácia de controle reduzida (Godoy *et al.*, 2021).

Sabendo que a ferrugem impacta diretamente a produtividade da soja, que o uso de fungicidas é necessário, mas a utilização inadequada e em excesso pode levar a resistência da ferrugem, é preocupante a redução, cada vez maior, do controle dessa doença safra após safra. Portanto, o objetivo deste trabalho foi conhecer a

tendência de resistência da ferrugem asiática da soja a fungicidas do grupo dos DMIs e Qols em uma série temporal de dados de onze safras na microrregião sojícola de Chapadão do Sul/MS e ainda, compreender melhor o comportamento do fungo ano após ano.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Campo experimental e tratamentos

Para a avaliação do comportamento temporal do controle da ferrugem em onze safras (2009/10; 2010/11; 2012/13; 2013/14; 2014/15; 2015/16; 2016/17; 2017/18; 2018/19; 2019/20 e 2020/21) na região de Chapadão do Sul, MS, foram obtidos dados de experimentos de campos conduzidos na instituição de pesquisa Fundação Chapadão, que integra a rede de ensaios cooperativos coordenado pela Embrapa Soja. Esta região contempla a macrorregião sojícola 3 (Kaster; Farias, 2012; Hirakuri *et al.*, 2020), mesorregião leste e microrregião de Cassilândia (IBGE, 1990).

Os ensaios de rede vêm sendo realizados desde a safra 2003/2004 para a comparação da eficiência de fungicidas registrados, e em fase de registro, para o controle da ferrugem asiática da soja. Nesses 11 experimentos, os fungicidas foram avaliados individualmente, em aplicações sequenciais, em semeaduras tardias, com a finalidade de determinar a eficiência de controle (Godoy *et al.*, 2021).

Os experimentos ao longo de onze safras (Tabela 1) foram conduzidos na área experimental da Fundação Chapadão, sempre nas coordenadas geográficas S: 018° 46' 26,1" e W: 52° 38' 47,2" em uma altitude média de 810 m.

Tabela 1 – Safras, cultivares, datas das semeaduras e estádios das aplicações com fungicidas na cultura da soja de onze safras em Chapadão do Sul, MS

Safras	Cultivares	Datas das semeaduras	Estádios no momento das aplicações ¹
2009/2010	P98Y11	19/11/2009	R1, R5.1 e R5.3
2010/2011	BRS Valiosa RR	19/11/2010	R1 e R4
2012/2013	BRS Valiosa RR	19/11/2012	R1 e R4
2013/2014	P98Y30	31/10/2013	R1, R5.1, R5.3
2014/2015	BRS Valiosa RR	28/11/2014	R1, R4 e R5.2
2015/2016	TMG Anta 82 RR	28/10/2015	R1, R5.1 e R5.4
2016/2017	5G 8015 RR IPRO	19/11/2016	R1, R5.1 e R5.2
2017/2018	M8372 IPRO	23/11/2017	V9, R3, R5.1 e R5.3
2018/2019	M8372 IPRO	23/11/2018	V10, R3, R5.1 e R5.3
2019/2020	M8372 IPRO	19/11/2019	V11, R3, R5.1 e R5.3
2020/2021	M8372 IPRO	19/11/2020	V11, R2, R5.1 e R5.3

Fonte: elaboração do próprio autor.

Nota: dados obtidos da Fundação Chapadão, MS. ¹Classificação dos estádios fenológicos da soja segundo Ritchie *et al.* (1997).

O clima da região foi classificado segundo Köppen, do tipo tropical úmido (Aw), com estação chuvosa no verão e seca no inverno e precipitação média anual de 1.850 mm, com temperatura média anual variando de 13°C a 28°C (Cunha; Magalhães; Castro, 2013).

O solo do ambiente experimental foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (EMBRAPA, 2006; Santos *et al.*, 2018).

A semeadura, em todas as safras, foi realizada com cultivares suscetíveis à ferrugem no sistema plantio direto (SPD). O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 4 repetições. As parcelas foram compostas por 7 linhas de 6 m e espaçamento de 0,45 m totalizando 18,9 m² de área de parcela conforme sugerido por BRASIL, 1989.

No decorrer do ciclo da cultura foram realizados tratamentos culturais como pulverização de herbicida, inseticida e adubação, conforme necessidade e recomendação na cultura da soja para a região (EMBRAPA, 2008; Seixas *et al.*, 2020).

Para a aplicação dos tratamentos com fungicidas foi utilizado um pulverizador costal de pressão constante de 3,0 kgf cm⁻², pressurizado a CO₂, equipado com uma barra de 2,0 m, com seis pontas pulverizadoras jato leque tipo XR 11002, espaçadas de 0,50 m, conduzida a uma altura de 0,50 m do alvo com volume de calda de 150 L ha⁻¹. Foram pulverizados os fungicidas tebuconazol (250 g/L) do grupo químico triazóis - DMI e azoxistrobina (200 g/L) do grupo das estrobilurinas – QoI durante as onze safras.

1.2.2 Avaliação da doença e obtenção dos dados climáticos

As avaliações de severidade da *P. pachyrhizi* na cultura da soja, foram realizadas em pelo menos dois estádios de desenvolvimento da soja em cada safra (Tabela 2), para obtenção do valor médio de severidade da parcela, em quatro pontos de avaliação.

Tabela 2 – Safras, datas e estádios da soja no início da doença, quantidade de avaliações e estádios que foram realizadas, quantidade de dias de epidemia e taxa média do progresso da Ferrugem Asiática na cultura da soja de onze safras em Chapadão do Sul, MS

Safras	Início da doença	Quantidade de avaliações	Estádio das avaliações	Dias de epidemia	Taxa de progresso da doença
2009/2010	15/01/2010 - R3	5	R5.1, R5.3, R5.5, R6, R7.1	46	48,2
2010/2011	09/02/2011 - R5.1	4	R5.4, R5.5, R6, R7.1	39	33,2
2012/2013	13/02/2012 - R5.2	5	R5.2, R5.3, R5.4, R5.5, R6	29	29,2
2013/2014	22/01/2014 - R5.2	3	R5.3, R5.5, R6	29	10,1
2014/2015	02/02/2015 - R4	4	R5.1, R5.3, R5.4, R5.5	39	12,4
2015/2016	12/01/2016 - R5.3	2	R5.5, R6	27	2,2
2016/2017	26/01/2017 - R3	5	R5.2, R5.3, R5.4, R5.5, R6	44	20,9
2017/2018	02/02/2018 - R4	4	R5.3, R5.4, R5.5, R6	38	12,1
2018/2019	28/01/2019 - R3	4	R5.1, R5.3, R5.4, R5.5	41	18,1
2019/2020	28/01/2020 - R4	5	R5.2, R5.3, R5.4, R5.5, R6	40	19,5
2020/2021	15/02/2021 - R5.3	5	R5.3, R5.4, R5.5, R6, R7.1	32	19,5

Fonte: elaboração do próprio autor.

Nota: dados obtidos da Fundação Chapadão, MS. ¹Classificação dos estádios fenológicos da soja segundo Ritchie *et al.* (1997).

As avaliações foram realizadas nas duas linhas centrais da parcela com auxílio de uma escala diagramática (Godoy; Koga; Canteri, 2006), que determina a porcentagem de área foliar lesionada em 10 folhas por parcela da metade inferior e superior da planta.

Após a quantificação da severidade, foi determinado à área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), de acordo com Shaner e Finney (1977): $AACPD = i \sum_{n=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1})/2 (t_{i+1} - t_i)]$, onde n é o número de avaliações, x é a severidade da doença e $(t_{i+1} - t_i)$ é o intervalo de tempo entre duas avaliações consecutivas (Shaner; Finney, 1977).

Em seguida, foi determinada a eficácia dos fungicidas (Abbott, 1925) através dos dados da AACPD. Foi calculado a porcentagem de eficácia (%E) dos tratamentos fungicidas em relação ao tratamento testemunha, de acordo com Abbott (1925): $\%E = (T - F)/T \times 100$. Onde: %E = Porcentagem de eficácia; T = AACPD média do tratamento testemunha, e F = AACPD do tratamento fungicida.

Para determinar o comportamento da ferrugem usamos a taxa média do progresso da doença. Foi quantificado os dias de epidemia desde a primeira infecção

constatada em cada safra até a última avaliação de severidade da doença. Os dados médios de progresso da doença (AACPD) em cada safra foram divididos pelo número de dias de epidemia, o resultado foi a taxa média de progresso da doença (Tabela 2).

Em todas as onze safras, os dados climáticos, temperatura do ar e umidade relativa do ar foram obtidos a partir da plataforma do INMET – Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil, que fornece informação, por hora, da mínima, máxima e média temperatura e umidade do ar. No entanto, neste trabalho foram utilizados dados da máxima e mínima temperatura do ar e dados médios da umidade relativa do ar.

Os dados pluviométricos foram coletados diariamente no local dos experimentos, por meio de pluviômetro de plástico. Na ocorrência de chuva, ao término de cada período (matutino e vespertino) foi registrado a quantidade de chuva (mm) ocorrida no dia. E, para verificar a quantidade de chuva ocorrida durante a noite, a observação do pluviômetro acontecia no início do outro dia. Os milímetros de chuva observados durante o dia e a noite foram somados.

1.2.3 Análise estatística

Para verificar a eficiência de cada ingrediente ativo (azoxistrobina e tebuconazol) no controle da ferrugem em soja ao longo das safras, foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Kendall ($\alpha = 0,05$). A eficiência foi verificada em termos de: ausência ou presença de tendência (positiva ou significativa) para perda de eficácia dos ingredientes ativos em questão. Posteriormente, para estas mesmas variáveis foram construídos gráficos para demonstrar a variabilidade dos fungicidas ao longo das safras.

Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Kendall por determinar se a série de dados analisada possui tendência temporal de alteração estatisticamente significativa. E, por basear-se em rejeitar ou não a hipótese nula (H_0), de que não exista tendência presente nos dados, adotando-se um nível de significância (α) (Salviano; Groppo; Pellegrino, 2016).

Foi utilizado este método também, por não exigir que os dados apresentem distribuição normal (Yue; Pilon; Cavadias, 2002), mas exige que sejam independentes e aleatórios (Neeti; Eastman, 2011), e ainda, por ser pouco influenciado por mudanças abruptas ou séries não homogêneas (Zhang *et al.*, 2009).

As análises foram realizadas no ambiente estatístico R (R Core Team, 2018), utilizando o pacote trend (Pohlert, 2018).

1.2.4 Índices de favorabilidade climática ao desenvolvimento da doença

Para sabermos o índice da favorabilidade climática à infecção e ao desenvolvimento do fungo *P. pachyrhizi* na região de Chapadão do Sul, MS, foram utilizadas informações de trabalhos da literatura, da estação meteorológica INMET e estação local do estudo, para a elaboração de favorabilidade de ocorrência da doença na área, onde foram atribuídas notas entre zero e um (0 e 1). Um significou a condição ótima para ocorrência da ferrugem asiática da soja, e zero condições menos favoráveis, onde a doença não teria progresso. Foram indicados números de temperatura em graus (°C), umidade relativa do ar em porcentagem (%) e precipitação em milímetro (mm).

Com informações, de diferentes autores, sobre temperatura e umidade ótima à infecção da *P. pachyrhizi* e desenvolvimento da doença (Marchetti; Melching; Bromfield, 1976; Kochman, 1979; Hegde *et al.*, 2002; Radons, 2012; Bonde; Nester; Bener, 2013; Nunes; Martins; Del Ponte, 2018), foram indicados dias com temperatura máxima, até 28° C e dias com temperatura mínima, 21° C. A partir disso, foram indicados os dias de temperatura ótima para germinação do urediniósporo e para a infecção do fungo na folha.

A umidade relativa do ar também foi indicada, adotada 85% para a consideração de condição de molhamento foliar (Radons, 2012). Assim, quando os dados da estação apresentavam valores iguais ou acima deste, determinou-se molhamento foliar, permitindo a estimativas de período diário de molhamento foliar.

Na determinação da quantidade de chuva que influencia na infecção e progresso da doença, foi utilizado a quantidade de precipitação mínima a partir de 9 mm e a máxima passando de 38,5 mm de chuva. Tendo como base o trabalho de Dufault *et al.*, (2010) para precipitação (45 ou 85 mm h⁻¹) que interferem negativamente na taxa de urediniósporos.

Ao fim, o índice da favorabilidade climática ao desenvolvimento da doença foi calculado para todas as safras separadamente. Foram somados os dias com temperatura ótima (entre 21 e 28 °C) aos dias com umidade ótima, desde a emergência da soja até a colheita. No caso da umidade ótima, foi somado a umidade relativa do ar

(>85%) a precipitação maior que 9 mm, descontando as precipitações maiores que 38,5 mm.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Eficácia dos grupos químicos triazol (DMI) e estrobilurinas (Qol) nas safras

Neste estudo, o grupo dos inibidores da desmetilação (DMI - triazóis), não apresentou redução significativa de eficácia ao longo das safras (Tabela 3). Enquanto o grupo dos inibidores externos de quinona (Qol - estrobilurinas) apresentou tendência para a resistência (Tabela 3).

Tabela 3 – *P*-valores dos testes de Mann-Kendall para as variáveis área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e Eficácia Abbott (%) (EF) para os ingredientes ativo Tebuconazol e Azoxistrobina

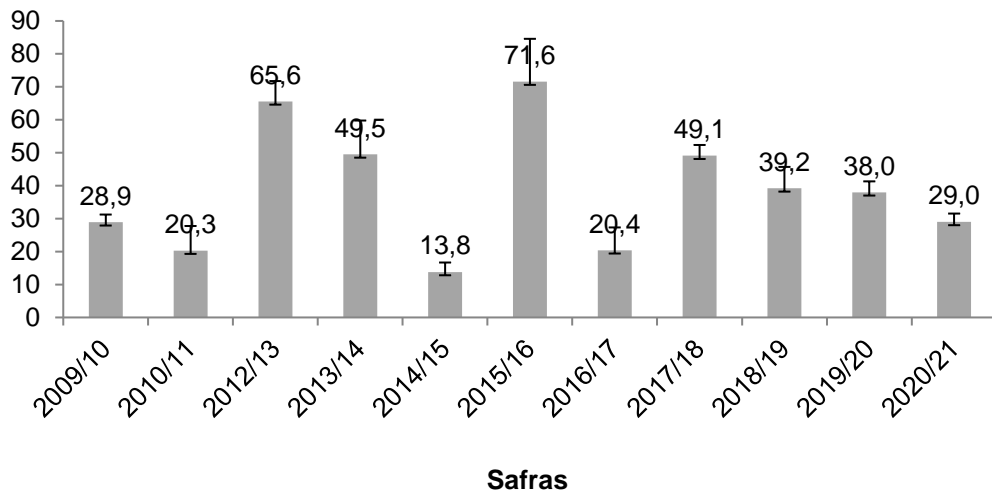
Fungicidas	Variável	Mann-Kendall
Tebuconazol	AACPD	0,64 ^{NS}
	EF	1,00 ^{NS}
Azoxistrobina	AACPD	0,18 ^{NS}
	EF	0,05*

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Nota: *significativo ($\alpha = 0.05$); não significativo (NS).

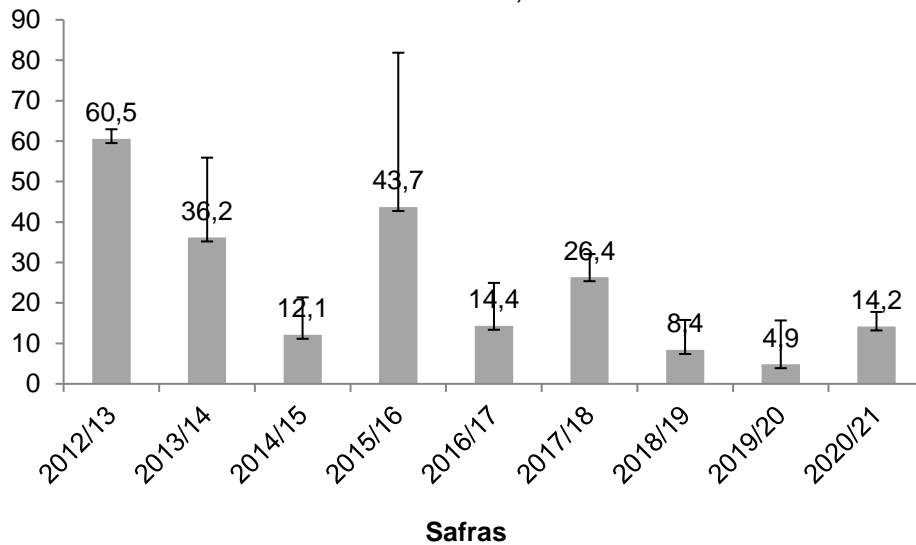
Esta análise foi corroborada pela variabilidade da eficácia dos fungicidas tebuconazol e azoxistrobina no controle da Ferrugem asiática da soja ao longo das onze safras (Figuras 1 e 2).

Figura 1 – Eficácia média (\pm desvio padrão) no controle da Ferrugem asiática da soja pelo fungicida tebuconazol (DMI) nas safras 2009/10 a 2020/21 no município de Chapadão do Sul, MS



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Figura 2 – Eficácia média (\pm desvio padrão) no controle da ferrugem asiática pelo fungicida azoxistrobina (QoI) nas safras 2012/13 a 2020/21 no município de Chapadão do Sul, MS

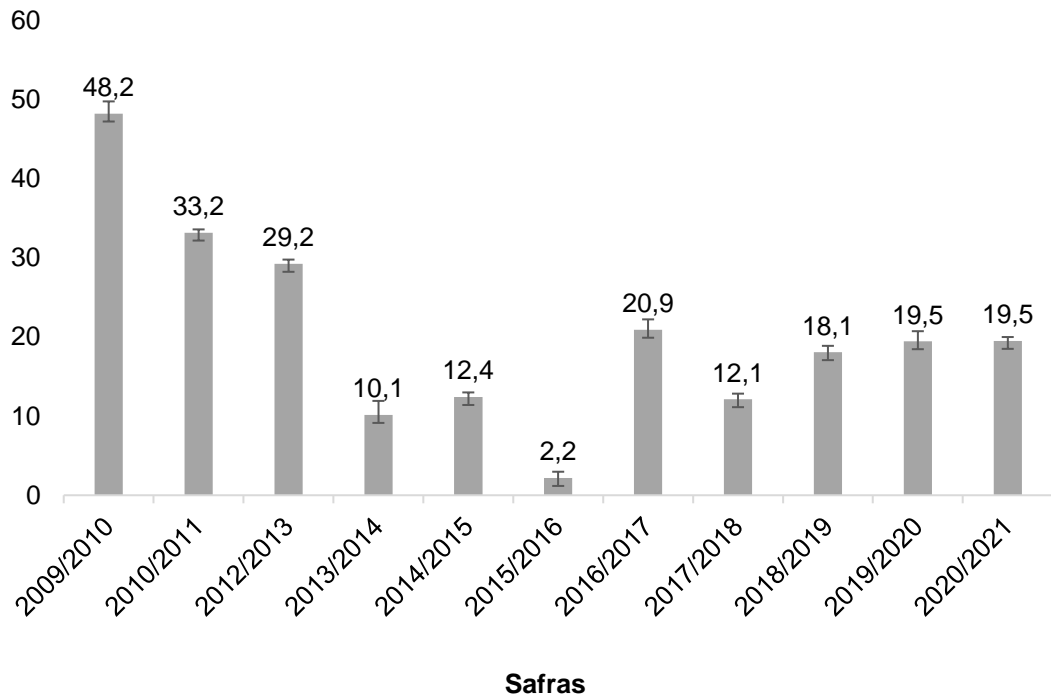


Fonte: elaborado pelo próprio autor.

1.3.2 Comportamento da Ferrugem nas safras

Nas parcelas testemunhas, sem a utilização de fungicidas, houve diferentes taxas de progresso da ferrugem ao longo das safras analisadas, onde foram obtidas variações entre 48,2 (2009/2010) e 2,2 (2015/16) (Figura 3).

Figura 3 – Severidade média da ferrugem asiática com desvio padrão, representado pela taxa de progresso da doença nas safras 2009/10 a 2020/21 no município de Chapadão do Sul, MS



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

1.3.3 Índice de favorabilidade climática ao desenvolvimento da doença

O índice de favorabilidade climática à infecção e desenvolvimento do fungo *P. pachyrhizi* na região de Chapadão do Sul, MS, foi calculado levando-se em consideração os fatores climáticos isolados: como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação (Tabela 4).

Tabela 4 – Safras, duração do ciclo da cultura em dias, quantidade de dias favoráveis à doença, índice de favorabilidade climática ao desenvolvimento da Ferrugem nas safras de 2009/10 a 2020/21 em Chapadão do Sul, MS

Safras	2009	2010	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
	/10	/11	/13	/14	/15	/16	/17	/18	/19	/20	/21
Ciclo da cultura	111	133	129	138	134	127	135	135	132	127	138
Dias favoráveis à doença	94	118	119	126	123	119	124	128	123	119	97
Dias de T °C ótima	93	103	110	122	119	119	118	120	122	119	72
Dias de URA (>85)	10	6	20	11	21	18	16	18	8	24	75
Dias chuva >= 9mm	45	42	37	27	31	35	37	40	32	38	30
Dias com chuva >=38,5	6	12	8	4	4	8	11	9	7	12	5
Dias de umidade ótima	49	36	49	34	48	45	42	49	33	50	100
Índice de favorabilidade climática	142	139	159	156	167	164	160	169	155	169	172

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

1.4 DISCUSSÃO

1.4.1 Eficácia dos grupos químicos triazol (DMI) e estrobilurinas (QoI) nas safras

A resistência do fungo *P. pachyrhizi* aos triazóis e estrobilurinas foi relatada no Brasil na safra 2007/08 e 2013/14 respectivamente (EMBRAPA, 2015). Mutações no gene nuclear que codifica para a proteína alvo do fungicida DMI, gene citocromo P450 na enzima 14- α - desmetilase (CYP51), como F120L, Y131H/F, K142R e I475T, ou por superexpressão de CYP51 (Schmitz *et al.*, 2014). E, mutações no gene do citocromo *b* (CYTB), nos códons 129, 137 e 143, bem como mutação F129L em isolados monouredinais, que conferem resistência aos fungicidas QoI (Klosowski *et al.*, 2016a).

Neste estudo, o grupo dos inibidores da desmetilação (DMI - triazóis) não apresentou redução de eficácia de controle do fungo *P. pachyrhizi* o longo das safras analisadas no município de Chapadão do Sul, assim não houve tendência para resistência do fungo *P. pachyrhizi* neste grupo. Ao contrário do grupo DMI, o grupo dos inibidores externos de quinona (QoI - estrobilurinas) apresentou tendência para a resistência do fungo *P. pachyrhizi* a esse grupo (Tabela 3).

Apesar do grupo DMI, representado pelo tebuconazol, estatisticamente não ter apresentado redução de eficácia no controle da ferrugem, visualmente a figura 1

mostra a falta de padrão no controle da doença ao longo das safras analisadas, essas oscilações de controle variaram de 13,8% a 71,6%. De uma safra para outra, 2014/15, 2015/16 e 2016/17 o mesmo fungicida demonstrou comportamento totalmente diferente, podendo ser observado mudança abrupta na eficiência de controle.

Uma das justificativas para a falta de tendência a menor sensibilidade do fungo ao fungicida, é devido aos DMIs apresentarem resistência quantitativa ou contínua, que se manifesta gradualmente, de forma parcial e variável em grau. Dessa forma, uma população menos sensível pode ser revertida para mais sensível se o fungicida for usado com menor intensidade ou com a utilização de fungicidas alternativos para o controle da doença (Brent; Hollomon, 2007).

Essa afirmativa é confirmada pelo trabalho de Klosowski (2015), que testou a sensibilidade do fungo *P. pachyrhizi* a fungicidas DMIs em duas áreas de produção de soja, convencional e orgânica. A população de *P. pachyrhizi* da área convencional apresentou menor sensibilidade ao tebuconazol, em relação a população do sistema de produção de soja orgânica. Isso se deve a indivíduo mutantes em áreas onde foi utilizado fungicida (área convencional), visto que, a resistência do fungo *P. pachyrhizi* aos triazóis está presente nas lavouras produtoras de soja do Brasil desde a safra 2007/08 (EMBRAPA, 2015). Essa resistência ocorre devido a mutação do fungo *P. pachyrhizi*, que ocorre no gene nuclear que codifica para a proteína alvo do fungicida DMI, gene citocromo P450 na enzima 14- α -desmetilase (CYP51) ou por superexpressão de CYP51 (Schmitz *et al.*, 2014).

Assim, a menor sensibilidade da *P. pachyrhizi* aos DMIs que foi observada graficamente, mas que não foi significativa estatisticamente, pode estar relacionada com aptidão competitiva, onde isolados mutantes têm desvantagens competitivas (esporulação, patogenicidade, crescimento micelial, período latente) na ausência de fungicida (Klosowski, 2015). Isolados menos sensíveis ao DMI apresentam desvantagens competitivas em comparação com isolados sensíveis e do tipo selvagem. Mas, é importante ressaltar, que a frequência de isolados resistentes diminui na ausência de fungicida, mas não são completamente eliminados da população (Klosowski *et al.*, 2016b).

Isolados resistentes a fungicidas com aptidão competitiva, só competem bem na natureza sob pressão de seleção do fungicida. Assim, a resistência pode ser parcialmente reversível quando a pressão de seleção do fungicida é removida ou minimizada. Portanto, reduzir o número total de aplicações com fungicidas DMI, alternar e/ou

associá-lo com fungicidas não resistentes pode favorecer o declínio de linhagens resistentes que apresentam déficit de aptidão (Brent; Hollomon, 2007; Mikaberidze; McDonald, 2015).

Ao contrário do que acontece com os triazóis, o grupo QoI representado pela azoxistrobina apresentou tendência para a resistência do fungo *P. pachyrhizi* a esse grupo. A resistência do grupo das estrobilurinas não pode ser reversível ou minimizada. Isso porque, a mutação F129L no gene CYTB no fungo *P. pachyrhizi* são mais frequentes, e não está associada à aptidão competitiva, como registrado em um experimento, que comparou isolado com sensibilidade reduzida ao QoI, com isolado possuindo o gene CYTB de tipo selvagem, e ambos competiram igualmente bem, nenhum dos isolados apresentaram desvantagens competitiva, assim a frequência de isolados mutados pôde ser estável mesmo na ausência de fungicida (Klosowski *et al.*, 2016b).

Essa tendência a resistência do fungicida pertencente ao grupo QoI é bem ilustrada na figura 2. Nela, foi observado redução na eficácia de controle da ferrugem ao longo das safras analisadas. Observou-se também que o número de aplicações aumentou ao longo das safras, de duas aplicações na safra 2012/13 para o dobro de aplicações na última safra analisada, 2020/21.

Em suma, a resistência dos fungicidas DMIs pode ser reversível porque depende da aptidão competitiva, na ausência de fungicida a frequência de fungos *P. pachyrhizi* resistentes é menor na área cultivada com soja, e também por causa da frequência das mutações, que ocorrem em algumas, mas não em todas as cópias do gene CYP51 no genoma de *P. pachyrhizi* (Schmitz *et al.*, 2014). Já a mutação F129L no gene CYTB, que confere resistência do fungo aos fungicidas QoIs, são mais frequentes porque o gene mutado é herdado mitocondrialmente, sendo presente em múltiplas cópias em uma célula o que significa que nenhum ou todos os genes CYTB são mutados (Klosowski, 2015).

É importante evidenciar também, que moléculas diferentes, mesmo pertencendo ao mesmo grupo químico, têm comportamento diferente, umas são mais eficientes que outras, e algumas perdem sua eficácia de controle antes que outras. Isso acontece, porque o mecanismo de reconhecimento do fungicida pelo fungo é diferente para cada produto, mesmo que pertençam ao mesmo grupo químico (Roese, 2011).

Outra justificativa ao resultado da análise de tendência desse trabalho, refere-se à classificação de resistência dos fungicidas triazóis e estrobilurinas. Os fungicidas

DIMs são classificados como risco médio de resistência (FRAC, 2023), possuem resistência quantitativa e de grau variável (Brent; Hollomon, 2007). Apesar da resistência ser conhecida em várias espécies de fungos, com diversos mecanismos envolvidos, os DIMs possuem grande diferença no espectro de atividade (FRAC, 2023).

Os fungicidas Qols são classificados como alto risco para a resistência (FRAC, 2023) pois o gene que confere resistência do fungo *P. pachyrhizi* a esse grupo é herdado mitocondrialmente e essa mutação não pode ser reversível e nem minimizada (Klosowski, 2015; Klosowski *et al.*, 2016b), devido a alteração na sequência de nucleotídeos do gene citocromo b, impedindo a ligação com o fungicida, conferindo resistência completa do patógeno ao fungicida (Kim *et al.*, 2003). O alto nível de resistência ocorre quando há mutação qualitativa, que consiste na substituição de uma glicina por uma alanina (G143A) na posição 143 (Godoy *et al.*, 2020).

Perante isso, e tendo em vista que os principais grupos de fungicidas com um único modo de ação disponíveis para controle da ferrugem apresentam adaptação do fungo, os fungicidas multissítios sintéticos (clorotalonil, mancozebe e oxicloreto de cobre) têm sido utilizados sozinhos ou em associação com fungicidas sítio-específicos, para aumentar a eficiência de controle, presumindo que resistência já ocorre no patossistema (FRAC, 2019).

Essa estratégia é válida em função do baixo risco de resistência, e também porque os fungicidas multissítios atuam em diferentes pontos metabólicos do fungo (FRAC, 2019; Godoy *et al.*, 2020). Contudo, devem ser misturados com fungicidas sítio-específicos que apresentem eficácia ao redor de pelo menos 50%, uma vez que, os multissítios não têm potencial para recuperar o controle de fungicidas sítio-específicos que apresentem eficácia inferior a 50% (Reis *et al.*, 2017).

Desse modo, do ponto de vista econômico e estratégico, para redução do impacto negativo causado pela doença, a medida de controle baseada no escape é uma excelente opção, pois, o clima tropical é favorável ao desenvolvimento da ferrugem durante todo o ano. Assim, é importante a prevenção da doença pela fuga em relação à presença do patógeno, semeando cultivares de soja precoces no início da época recomendada. As primeiras semeaduras realizadas após o vazio sanitário tendem a apresentar sintomas da doença a partir da fase de enchimento de grãos, quando apresentam (FRAC, 2019).

1.4.2 Comportamento da ferrugem nas safras

A ocorrência de inóculo no ano todo e fatores climáticos influenciam na incidência e progresso da ferrugem. Ao longo das onze safras estudadas, o fungo *P. pachyrhizi* teve comportamento diferente, com taxa de progresso da doença variando de uma safra para outra (Figura 4).

Na safra de 2009/2010 a doença iniciou seu ciclo na primeira quinzena de janeiro (Tabela 2), com 46 dias de epidemia desde sua incidência na área. Essa ocorrência pode ter sido em virtude do El Niño moderado, que proporcionou inverno chuvoso, e garantiu a sobrevivência de plantas voluntárias e do fungo *P. pachyrhizi* em várias regiões durante a entressafra (Consórcio Antiferrugem, 2019). Além disso, as condições climáticas durante a safra foram favoráveis para o progresso da ferrugem (Tabela 4).

Na safra 2010/2011, na área experimental a incidência da ferrugem ocorreu em fevereiro, conseqüentemente menos dias da soja em contato com o fungo (39 dias) (Tabela 2). Assim, o progresso da doença foi menor que no ano anterior (Figura 4), devido ao inverno seco que desfavoreceu a manutenção do inóculo que sobrevivem em plantas voluntárias na entressafra (Consórcio Antiferrugem, 2019). Isso também foi observado na estação, onde durante o ciclo da cultura foram 36 dias de umidade ótima ao desenvolvimento da doença, mas apenas 6 dias de umidade relativa do ar em condições de molhamento foliar (85%) (Tabela 4) (Radons, 2012). Houve também 12 dias com precipitações acima de 38,5 mm (DUFALTY *et al.*, 2010) que pode ter interferido negativamente na quantidade de uredospóros. Assim, foi obtido menor progresso da doença.

Episódios diferentes ocorreram na safra 2011/2012, em decorrência do fenômeno La Niña (CPTEC, 2022) que proporcionou seca no nordeste de Mato Grosso do Sul, mas especificamente em Chapadão do Sul, desfavorecendo a presença do inóculo da Ferrugem nas lavouras de soja. Dessa forma, não houve a doença ferrugem nesta safra.

A incidência da ferrugem na safra 2012/2013 ocorreu na primeira quinzena de fevereiro na fase do enchimento de grãos (R5.2) (Tabela 2). A entrada tardia do inóculo na área de cultivo ocorreu devido às chuvas irregulares que atrasaram a semeadura no Centro Oeste, em função do fenômeno El Niño predominante nesta safra, mas em novembro ele perdeu força e o clima mudou para a neutralidade. Além disso, no

Sul do país a ocorrência de chuvas irregulares desfavoreceu a doença (Consórcio Antiferrugem, 2019), uma vez que chuvas em volumes intensos ou dias seguidos de precipitação são prejudiciais a esporulação, interferido negativamente na taxa de uredósporos disponíveis para infecção no dossel da lavoura (DUFALTY *et al.*, 2010).

Na safra 2013/2014, a ferrugem avançou na região Centro-Oeste na segunda quinzena de janeiro na unidade experimental, com as plantas no estágio de enchimento de grãos (R5.2) (Tabela 2). As chuvas no nordeste de Mato Grosso do Sul foram em baixo volume, não favorecendo o progresso da doença (Figura 4), e, na estação foram 27 dias precipitação ótima ao desenvolvimento da doença e 11 dias de umidade relativa indicando molhamento foliar (Tabela 4) (Radons, 2012).

O progresso da doença na safra 2014/2015 foi maior que na safra anterior na estação experimental (Figura 4), em função das chuvas constantes e alto volumes desde a semeadura até a colheita, e 20 dias com umidade relativa (>85%) ótima ao desenvolvimento do fungo (Tabela 4) (Radons, 2012). Além disso, houve relato da incidência da ferrugem em soja voluntária na entressafra, devido ao inverno menos rigoroso na região Sul. Em Mato Grosso do Sul, também foi relatado ocorrência da ferrugem em soja guaxa (Consórcio Antiferrugem, 2019).

Na safra 2015/2016, a incidência da ferrugem na área experimental, ocorreu na primeira quinzena de janeiro com a soja no estágio R5.3 (Tabela 2). O progresso da doença não foi expressivo devido à estiagem no Centro-Oeste, mesmo com inóculo de *P. pachyrhizi* na entressafra em consequência do inverno menos rigoroso na região Sul e excesso de chuvas, que permitiu a sobrevivência de soja guaxa. Excesso de chuvas na região Sul e estiagem no Centro-Oeste foram resultados do El Niño forte nessa safra (Consórcio Antiferrugem, 2019).

Na safra de 2016/2017, o fenômeno predominante foi o La Niña, com menor intensidade (CPTEC, 2022). Chuvas normais no Centro-Oeste. Houve seca na Bolívia. Na região Sul as temperaturas foram baixas até outubro, o que favoreceu o “vazio sanitário natural” (Consórcio Antiferrugem, 2019). Mesmo com a redução de inóculo do fungo vindo da Bolívia e sul do país, na estação, houve grande progresso da doença, que pode ser explicado pela incidência da doença no estágio vegetativo da planta (R3), totalizando 44 dias de epidemia (Tabela 2), somando com as condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo (Tabela 4), a ferrugem progrediu (Figura 4).

Na safra 2017/2018 a incidência da ferrugem na estação ocorreu no dia 02 de fevereiro com a cultura no estágio R4 (Tabela 2), por causa dos atrasos nas chuvas

no Centro-Oeste (Consórcio Antiferrugem, 2019), proporcionado pelo La Niña moderado (CPTEC, 2022). O progresso da doença foi menor em relação à safra passada, em virtude do menor contato da cultura da soja com o fungo, 38 dias de epidemia (Tabela 2).

O progresso da ferrugem no ano agrícola 2018/2019 foi maior que na safra anterior, em função da grande sobrevivência de plantas de soja voluntárias do inverno em várias regiões, fazendo com que a doença chegasse mais cedo nas áreas de cultivo, como foi o caso do Paraná, em 31/10, e do país vizinho, Paraguai, onde a primeira ocorrência foi em 15/10 (Consórcio Antiferrugem, 2021a), e na área experimental foi em 28/01/2019 - R3 (Tabela 2). Somado a isso, a ocorrência de chuvas regulares na região de Chapadão do Sul, MS, foi determinante para o desenvolvimento da ferrugem.

Na safra 2019/2020 os primeiros sintomas da Ferrugem foram constatados na segunda quinzena de janeiro, com a cultura no estágio reprodutivo, R4 (Tabela 2). Em Chapadão do Sul, MS, as condições climáticas, estavam ótimas para o desenvolvimento do fungo. Foram 24 dias com umidade relativa maior que 85% (Tabela 4), indicando molhamento foliar (Radons, 2012). Nessa entressafra também foram constatadas presença de ferrugem em soja guaxa (Consórcio Antiferrugem, 2021b).

Na safra 2020/2021 os coletores do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR – Paraná) detectaram esporos do fungo *P. pachyrhizi* em 26 de outubro, na região oeste do Paraná, e o serviço de monitoramento do Paraguai também detectou a presença do fungo em plantas voluntárias de soja e no kudzu (*Pueraria lobata*), hospedeiro alternativo do fungo. A presença de inóculo na região, a antecipação do período chuvoso e as frente frias com chuvas e ventos, favoreceram a dispersão de esporos de fontes de inóculo remanescente no período do inverno (Consórcio Antiferrugem, 2021b). Na área experimental, a presença inicial da doença ocorreu na segunda quinzena de fevereiro (Tabela 4), com constante progresso.

1.4.3 Índice de favorabilidade climática ao desenvolvimento da doença

O progresso da ferrugem asiática da soja é extremamente dependente das condições ambientais durante a estação, por ser uma doença policíclica, as folhas infectadas durante o ciclo da cultura servem de fonte de inóculo para novas infecções durante o mesmo ciclo. Os fatores climáticos como temperatura, umidade relativa do ar

e precipitação, podem ser um indicativo de favorabilidade climática ao desenvolvimento da doença (Godoy; Barros; Xavier, 2012).

Assim, sabendo que doenças e ambiente estão intimamente relacionados (Radons, 2012), a sobrevivência de esporos no ar é fortemente afetada por fatores ambientais, como temperatura, radiação solar e ultravioleta, e umidade relativa. Esporos transportados por ventos predominantes são depositados na superfície de outras folhas de plantas hospedeiras (Nunes; Martins; Del Ponte, 2018).

Em condições úmidas os urediniósporos de *P. pachyrhizi* germinam e infectam a folha sob temperaturas entre 14 a 22 °C, mas na ausência de umidade isso ocorre na temperatura de 20 °C (Marchetti; Melching; Bromfield, 1976).

Temperatura extremas, muito baixa, inferior a 5 °C, assim com temperatura muito alta superior a 30 °C reduzem a viabilidade e sobrevivência dos esporos da (Hegde *et al.*, 2002), por reduzirem cerca de 80% a produção de esporos *P. pachyrhizi*, refletindo em ausência ou atraso de desenvolvimento da epidemia de ferrugem asiática (Bonde; Nester; Bener, 2013). Kochman, (1979) também observou redução no desenvolvimento dos esporos do fungo *P. pachyrhizi* quando expostos a temperaturas de 28,6° a 42,5°.

Portanto, em condição de água livre na superfície da folha, os urediniósporos germinam, sob temperaturas ótimas (18 a 26 °C) e umidade relativa entre 75% e 80% (Nunes; Martins; Del Ponte, 2018). Antes disso, Kochman, (1979) constatou a sobrevivência de uredósporos sob faixas de temperatura de 17° a 27° C.

A elevada frequência de chuva e alta intensidade de orvalho, são favoráveis às infecções e ao desenvolvimento da ferrugem (Sikora *et al.*, 2014). A umidade relativa do ar é um dos elementos que mais influenciam no tempo de molhamento foliar, necessário para que o processo de infecção inicie e se complete, resultando em favorecimento da progressão da doença (Radons, 2012).

A umidade relativa do ar é comumente utilizada como um indicador e pode ser usada para estimar o período de molhamento foliar (Streck, 2006; Radons, 2012). E a temperatura do ar atua como catalisador biológico dos patógenos, acelerando seu crescimento e desenvolvimento (Radons, 2012).

A água livre decorrente da chuva é fonte de molhamento foliar, e juntamente com a umidade decorrente do orvalho, afetam principalmente a infecção e a esporulação de fungos fitopatogênicos, sendo disseminado regionalmente, acelerando epidemias como a da ferrugem asiática da soja (Nunes; Martins; Del Ponte, 2018).

Esse efeito direto na epidemia da ferrugem proporcionados pela chuva, está relacionado com o impacto das gotas de água que dispersam os uredósporos entre as folhas da soja, fazendo a dispersão dentro do dossel da cultura, principalmente nos estágios iniciais da doença (Fitt; McCartney; Walklate, 1989; Madden, 1992; Del Ponte, *et al.*, 2006).

A precipitação é importante na severidade da ferrugem asiática da soja, por contribuir na extensão da duração do período de molhamento foliar, redução da temperatura dentro do dossel até o ótimo, e consequente liberação dos esporos (Del Ponte *et al.* 2006), acelerando o progresso da epidemia, quando a distribuição de chuvas ocorre em maiores volumes, em relação à quando ocorrem em menores volumes, onde a doença progride mais lentamente (Godoy *et al.*, 2009).

Mas obviamente as chuvas não podem ser exacerbadas ao ponto de serem prejudiciais a esporulação (Godoy *et al.* 2009), em volumes intensos de chuva (45 ou 85 mm h⁻¹) ou dias seguidos de precipitação, acabam interferindo negativamente na taxa de uredósporos disponíveis para infecção no dossel da lavoura (Dufault *et al.*, 2010).

Somado a isso, enquanto há orvalho a liberação de esporos é mínima, aumentando após as folhas secarem (Nunes; Martins; Del Ponte, 2018). No experimento de Moraes (2018) este episódio foi evidenciado, onde o maior volume de chuvas acumulado no período foi registrado justamente quando ocorreu este declínio na progressão da Ferrugem.

1.5 CONCLUSÃO

Nas onze safras analisadas não houve tendência para resistência do fungo *P. pachyrhizi* ao grupo triazol, representado pelo tebuconazol. Houve tendência de resistência do fungo *P. pachyrhizi* ao fungicida do grupo QoI, azoxistrobina.

A aptidão competitiva do fungo *P. pachyrhizi* pode ter promovido a ausência de tendência para resistência ao triazol. A tendência de resistência do fungo ao QoI - azoxistrobina, ocorre devido à estabilidade e frequência de isolados mutados mesmo na ausência de fungicida. Assim, esse tipo de resistência não pode ser reversível ou minimizada

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BENER, D. K. Effects of frequency of “extreme” temperature highs on development of soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 7, p. 708-716, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA; Sistema de Agrotóxico Fitossanitário – AGROFIT. **Consulta de pragas e doenças**: produtos Indicados. 2024. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 03 fev. 2024.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Secretaria de Defesa Agropecuária – MAPA/DAS. Portaria SDA Nº 516, de 1º de fevereiro de 2022. Estabelece os períodos de vazio sanitário vegetal para a cultura da soja, em nível nacional para o ano de 2022. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24. ed., 03 fev. 2022. Seção 1, p. 18. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-sda-n-516-de-1-de-fevereiro-de-2022-377895004>. Acesso em: 25 ago. 2023.
- BRENT, K. J.; HOLLOWAY, D. W. **Fungicide resistance in crop pathogens**: How can it be managed?. 2. ed. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee – FRAC, 2007. 60p.
- CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS – CPTEC. **Condições atuais do ENOS**: La Niña – Últimas ocorrências. 2022. Disponível em: <http://enos.cptec.inpe.br/>. Acesso em 23 ago 2022.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento das safras brasileiras de grãos: quinto levantamento. **Boletim da Safra de Grãos**, Brasília, DF, v. 11, n. 5, p. 90-109, 2024.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Custo ferrugem asiática da soja**. 2019. Disponível em: http://acacia.cnpsa.embrapa.br:8080/cFerrugem_files//764411951/Tabela_resumo_Ferrugem_atual.pdf. Acesso em: 30 jan. 2022.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Mapa da dispersão**. 2024a. Disponível em: <http://www.consorcioantiFerrugem.net/#/main>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Monitoramento no Paraguai e Brasil identificam Ferrugem em soja voluntária, kudzu e coletores**. 2021b. Disponível em: <http://www.consorcioantiFerrugem.net/#/main>. Acesso em: 30 jan. 2024.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Vazio sanitário e regulamentação de janela de semeadura – Normativas Brasil e Paraguai**. 2021a. Disponível em: <http://www.consorcioantiFerrugem.net/#/conteudos/view/14>. Acesso em: 30 jan. 2022.

CUNHA, F. F., MAGALHÃES, F. F., CASTRO, M. A. Métodos para estimativa da evapotranspiração de referência para Chapadão do Sul – MS. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 21, n. 2, p.159-172, 2013.

DEL PONTE, E. M. *et al.* Predicting severity of Asian soybean rust with empirical rainfall models. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 7, p. 797-803, 2006.

DUFAUT, N. S. *et al.* The influence of rainfall intensity and soybean plant row spacing on the vertical distribution of wet deposited *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Heidelberg, v. 32, n. 2, p. 162-169, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Risco do surgimento e do aumento de população resistente a fungicida do fungo causador da Ferrugem-asiática da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 2 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/Ferrugem/notastecnicas>. Acesso em: 4 fev. 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja-região central do Brasil 2009 e 2010**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 262 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja-região central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265p.

FITT, B. D. L.; MCCARTNEY, H. A., WALKLATE, P. J. Role of rain in the dispersal of pathogen inoculum. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.27, p.241-270, 1989.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE – FRAC. **Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC groups on product labels)**. Basel: Fungicide Resistance Action Committee, 2023. Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2023---final.pdf>. Acesso em: 15 jan 2024.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE – FRAC. **Recomendações para o uso de triazóis e triazolintione no manejo da Ferrugem asiática da soja**. Holambra: [s. n.]. 2019. Disponível em: https://www.frac-br.org/_files/ugd/85b1d3_7ac3ab6d8b904f6e8aec5d654b5b7f88.pdf. Acesso em: 26 jul. 2023.

GODOY, C. V. *et al.* **Boas práticas para o enfrentamento da Ferrugem-asiática da soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2017. 6 p.

GODOY, C. V. *et al.* **Eficiência de fungicidas para o controle da Ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2020/2021:** resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2021. 25 p. Circular Técnica 174.

GODOY, C. V. *et al.* Eficiência do controle da Ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 34, n. 1, p. 56-61, 2009.

GODOY, C. V. *et al.* **Ferrugem-asiática da soja:** bases para o manejo da doença e estratégias antirresistência. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 39 p.

GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia brasileira**, Heidelberg, v.31, n.1, 63–68, 2006.

GODOY, C. V.; BARROS, D. C. M.; XAVIER, S. A. **Avaliação de regimes de temperatura no desenvolvimento da Ferrugem-asiática da soja.** *In:* Workshop sobre mudanças climáticas e problemas fitossanitários, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012.

HARTMAN, G. L. *et al.* **Compendium of soybean diseases and pests**, 5. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2015, 201 p.

HEGDE, A. K. H. *et al.* Germination of uredospores of *Phakopsora pachyrhizi* causing soybean rust. **Plant Pathology Newsletter**, Chichester, v. 20, n. 4, p. 24-25, 2002.

HENNING, A. A. *et al.* **Manual de identificação de doenças de soja.** 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 76 p.

HIRAKURI, M. H. *et al.* **Diagnóstico da produção de soja nas macrorregiões sojícolas 2 e 3.** Londrina: Embrapa Soja, 2020, 124 p. Documento 435.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Divisão regional do Brasil em mesorregiões e microrregiões geográficas.** Rio de Janeiro: IBGE, 1990. p. 125-126. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv2269_1.pdf. Acesso em 23 mai. 2023.

ISHII, H.; HOLLOMAN, D.W. **Fungicide resistance in plant pathogens:** principles and a guide to practical management. Tokyo: Springer, 2015. 490 p.

JULIATTI, F. C.; BELOTTI, I. F.; JULIATTI, B. C. M. Mancozeb associado a triazóis e estrobilurinas no manejo da Ferrugem da soja. **Reunião de Pesquisa de Soja**, Londrina, v. 34, p. 253-254, 2014.

- KASTER, M.; FARIAS, J. R. B. **Regionalização dos testes de valor de cultivo e uso e da indicação de cultivares de soja - Terceira aproximação**. Londrina: Embrapa Soja, 2012, 69 p. Documentos 330.
- KIM, Y. S. *et al.* Field resistance to Strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 7, p. 891-900, 2003.
- KLOSOWSKI, A. C. *et al.* Competitive Fitness of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates with mutations in the CYP51 and CYTB Genes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 106, n. 11, p.1278-1284. 2016b.
- KLOSOWSKI, A. C. *et al.* Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest Management Science**, Oxford, v. 72, n. 6, p. 1211-1215, 2016a.
- KLOSOWSKI, A. C. **Sensibilidade de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* aos fungicidas Tebuconazol (inibidor de desmetilação) e Azoxistrobina (inibidor da quinona externa)**. 2015. 99 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- KOCHMAN, J. K. The Effect of Temperature on Development of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Plant Pathology Branch**, Basel, v. 30, n. 2, p. 273-277, 1979.
- LI, X. *et al.* The uniqueness of the soybean rust pathosystem: An improved understanding of the risk in different regions of the world. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p.796-806, 2010.
- MADDEN, L. V. Rainfall and dispersal of fungal spores. **Advances in Plant Pathology**, San Diego, v. 8, p.39-79, 1992.
- MARCHETTI, M. A.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 461-463, 1976.
- MIKABERIDZE, A.; MCDONALD, B. A. Fitness Cost of Resistance: impact on Management. *In*: ISHII, H.; HOLLOMON, D. (ed.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer, 2015. p. 77-89.
- MORAES, M. P. **Sistema agrometeorológico de previsão para Ferrugem Asiática da soja**. 2018. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2018.
- MOURA, B. **Ferrugem-asiática da soja: interações entre cultivares e volumes de calda no controle da doença e sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. 2018. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

NASCIMENTO, F. G. **Controle de doenças em soja com diferentes manejos e momentos de aplicação de fungicidas baseados no índice de área foliar**. 2018. 39 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitotecnia) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

NEETI, N.; EASTMAN, J. R. A Contextual Mann-kendall approach for the assessment of trend significance in image time series. **Transactions in GIS**, Chichester, v. 15, n. 5, p. 599-611, 2011.

NUNES, C. D. M.; MARTINS, J. F. S.; DEL PONTE, E. M. **Validação de modelo de previsão de ocorrência da Ferrugem asiática da soja com base em precipitação pluviométrica**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2018, 13 p. Circular Técnica 199.

POHLERT, T. **Trend**: Non-parametric trend tests and change-point detection R package version 1.1.0. 2018. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=trend>. Acesso em: 30 jan. 2024.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 19 jan 2024.

RADONS, S. Z. **Análise numérica de risco climático de ocorrência de requeima na cultura da batata na região central do Rio Grande do Sul**. 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

REIS, E. M. *et al.* **Evolução da redução da sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas e estratégia para recuperar a eficiência do controle**. 3. ed. Passo Fundo: Berthier, 2017. 103 p.

RIBEIRO, F. C. *et al.* Fungicidas aplicados na cultura da soja visando o controle da Ferrugem asiática no estado do Tocantins. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 9, n. 2, p. 73-84, 2016.

RITCHIE, S. W. *et al.* **How a soybean plant develops**. Special Report n. 53. Ames: State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, 1997. 20 p.

ROESE, A. **O melhor fungicida contra a Ferrugem asiática da soja**. 2011. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcglclefind-mkaj/https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/40715/1/O-melhor-fungicida-alexandre.pdf>. Acesso em: 25 ago 2022.

SALVIANO, M. F.; GROppo, J. D.; PELLEGRINO, G. Q. Análise de tendências em dados de precipitação e temperatura no Brasil. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.31, n.1, 64-73, 2016.

SANTOS, H.G. *et al.* **Sistema brasileiro de classificação de solos**, 2. ed. Brasília: Embrapa Solos, 2018. 356 p.

SCHMITZ, H. K. *et al.* Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards Quinone-outside-inhibitors and Demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, Oxford, v. 70, n. 3, p.378-388, 2014.

SEIXAS, C.D.S. *et al.* **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 347 p. Sistema de produção 17.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SIKORA, E. J. *et al.* A coordinated effort to manage soybean rust in North America: A success story in soybean disease monitoring. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 7, p. 864-875, 2014.

STRECK, L. **Determinação e estimativa da duração do período de molhamento em cultivos de batata**. 2006. 107 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

YORINORI, J. T. Development and Economic Importance. *In*: YORINORI, J. T. **Soybean rust: lessons learned from the pandemic in Brazil**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2021a. p. 1-13.

YUE, S.; PILON, P.; CAVADIAS, G. Power of the Mann–Kendall and Spearman's Rho Tests for detecting monotonic trends in hydrological series. **Hydrology**, Basel, v. 259, n. 1-4, p. 254-271, 2002.

ZHANG, W. *et al.* Temporal and spatial variability of annual extreme water level in the Pearl River Delta Region, China. **Global and Planetary Change**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p.35-47, 2009.

2 AEROBIOLOGIA DO PATÓGENO DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA: MONITORAMENTO DE INÓCULO E DETECÇÃO DE ALELO DE RESISTÊNCIA (*SdhC*-I86F) A FUNGICIDA

RESUMO

A doença ferrugem asiática da soja é causada pelo fungo basidiomiceto *Phakopsora pachyrhizi*. Considerada mundialmente uma das doenças mais importantes da soja, a ferrugem pode causar perdas significativas na produção. As populações desse fungo são consideradas altamente adaptáveis às estratégias de manejo químico, dado seu caráter intensivo e a aplicação em larga escala de fungicidas específicos de alto risco para resistência. Essas populações têm apresentado resistência aos três principais grupos químicos de fungicidas: triazóis (DMI), estrobilurinas (QoI) e carboxamidas (SDHI). No Brasil, desde 2013, os fungicidas SDHI são utilizados para o controle da ferrugem e apresentam alto risco para a emergência de resistência se forem usados isoladamente. Como medidas apropriadas anti-emergência de resistência não foram tomadas, a resistência à SDHI emergiu e foi dispersa por todo o país. Para preencher uma lacuna de conhecimento atual sobre a prevalência de resistência a fungicidas SDHI na região de Chapadão do Sul, MS, buscou-se com esse trabalho monitorar a dispersão da mutação que confere ao fungo resistência a fungicidas do grupo dos SDHIs por meio de aerobiologia do patógeno. Para isso, no período de outubro de 2020 a janeiro de 2022, foi utilizado como ferramenta o coletor de esporos SIGA, para capturar esporos fúngicos transportados pelo ar. Essa técnica foi somada à técnica molecular de PCR quantitativo em tempo real (qPCR TR) para detectar e quantificar a flutuação temporal dos alelos do gene *sdhC* da *P. pachyrhizi* selvagem (I86) e mutante (86F). No período analisado, detectou-se inóculo da *P. pachyrhizi*, tanto durante a safra, quanto no pousio sem a cultura na área. Evidenciou-se que populações do patógeno com a mutação 86F no gene *sdhC* para resistência a SDHIs estão presentes em Chapadão do Sul. Além disso, foi demonstrada a oscilação temporal na prevalência da mutação 86F para resistência a SDHIs.

Palavras-chave: aerobiologia; medidas anti-resistência; monitoramento da dispersão de *Phakopsora pachyrhizi* com gene de mutação; manejo químico; resistência a fungicidas.

AEROBIOLOGY OF THE ASIAN SOYBEAN RUST PATHOGEN: INOCULUM MONITORING AND FUNGICIDE RESISTANCE ALLELE (*SdhC*-I86F) DETECTION

ABSTRACT

The Asian soybean rust is caused by the basidiomycete fungus *Phakopsora pachyrhizi*. Considered one of the most important diseases of soybeans worldwide, rust can cause significant losses in production. These fungus populations are considered highly adaptable to chemical management strategies, given their intensive nature and the large-scale application of site-specific fungicides with high-risk for resistance. These populations have shown resistance to the three main chemical groups of fungicides: triazoles (DMI), strobilurins (QoI) and carboxamides (SDHI). In Brazil, since 2013, SDHI fungicides have been used to control rust and present a high-risk of the emergence of resistance if used alone. Since appropriate anti-resistance emergency measures were not taken, resistance to SDHI emerged and was spread throughout the country. To fill a gap in current knowledge about the SDHI fungicides resistance prevalence in the Chapadão do Sul, MS region, this work aims to monitor the spread of the mutation that confers resistance to SDHI fungicides to the fungus through aerobiology of the pathogen. For this purpose, from October 2020 to January 2022, SIGA spore collectors were used as a tool to capture airborne fungal spores. This technique was associated with molecular detection by quantitative real-time PCR (RT qPCR) to detect and quantify the *sdhC* gene temporal fluctuation of the wild-type (I86) and mutant (86F) alleles of *P. pachyrhizi*. During the analyzed period, *P. pachyrhizi* inoculum was detected, both during the cropping season and during the fallow period without the crop in the area. It was found that pathogen populations with the 86F mutation in the *sdhC* gene for resistance to SDHIs are present in Chapadão do Sul. In addition, it was demonstrated a temporal oscillation in the prevalence of the 86F mutation for resistance to SDHIs.

Keywords: aerobiology; anti-resistance measures; monitoring the spread of *Phakopsora pachyrhizi* with the mutation gene; chemical management; fungicide resistance.

2.1 INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja é uma doença de importância mundial causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. Desde o surgimento da doença no Brasil, em 2001 (Yorinori, 2021a), o patógeno se espalhou para a maioria das regiões brasileiras produtoras de soja (Consórcio Antiferrugem, 2024a) e de outros países da América do Sul, como o Paraguai e Argentina (Li *et al.*, 2010; Yorinori, 2021a).

A expansão geográfica eficiente do patógeno na América do Sul tem sido associada à grande capacidade do fungo *P. pachyrhizi* em se conectar entre áreas e as condições ambientais propícias para a sobrevivência e desenvolvimento do patógeno durante todo o ano, proporcionando fontes permanentes de inóculo da ferrugem (Li *et al.*, 2010). Mas, não apenas na América do Sul, a ferrugem ocorre em todos os países produtores de soja no mundo (Li *et al.*, 2010; Henning *et al.*, 2014). Por isso, existe a necessidade de desenvolver estratégias para impedir a disseminação desse patógeno para outras áreas de cultivo de soja livre da doença, uma vez que, o manejo da doença é um dos principais desafios dos produtores.

O patógeno é altamente adaptável às estratégias de controle, com tolerância fúngica às principais classes de fungicidas específicos, tornando o controle químico menos eficaz (Godoy *et al.*, 2016; Barro *et al.*, 2021). Além disso, a quebra da resistência genética presente nas cultivares de soja (Akamatsu *et al.*, 2013; Paul *et al.*, 2013), tornam o número de soluções práticas para o controle da doença limitado. Dessa forma, as perdas em produtividade podem chegar a 100% (Yorinori, 2021b).

O conhecimento sobre a biologia populacional do fungo é importante na descoberta de novos modos de ação contra a *P. pachyrhizi*, a disponibilidade de um genoma de referência de alta qualidade é essencial. A grande dificuldade na caracterização do genoma do fungo pelas técnicas de sequenciamento, decorrentes do tamanho e complexidade do genoma desse patógeno (EMBRAPA, 2019). Contudo, estudos recentes com isolados de *P. pachyrhizi* possibilitaram a realização e conclusão do sequenciamento e montagem do genoma (Gupta *et al.*, 2023).

A natureza complexa do genoma do fungo foi desvendada por meio do sequenciamento de última geração, onde as leituras de pequenos e longos fragmentos de DNA foram realizadas através de Illumina e PacBio, respectivamente. O genoma da *P. pachyrhizi* é extremamente rico em sequências repetitivas e DNA não codificante, constituindo aproximadamente 90% de todas as sequências, e abriga várias famílias

de transposons, elementos que podem permitir que o patógeno se adapte rapidamente a novos ambientes (Gupta *et al.*, 2023).

Essa técnica além de contribuir para decifrar a biologia do fungo, auxilia no entendimento a nível molecular e a sua complexa interação com a soja, ampliando o entendimento da adaptabilidade, evolução e diversidade genética de *P. pachyrhizi*. Esse conhecimento abre caminhos para novas estratégias de manejo e controle da ferrugem asiática na soja (EMBRAPA, 2019).

Atualmente, a principal estratégia de manejo utilizada para a diminuição do inóculo da *P. pachyrhizi* e para promover o escape da doença, é o vazio sanitário, medida legislativa com determinações estaduais de períodos em que a área fica sem plantas de soja, o principal hospedeiro do fungo. Outra técnica recomendada, consiste na semeadura de cultivares precoces e/ou com genes de resistência no início do período de semeadura (Godoy *et al.*, 2020a).

Após a chegada do inóculo na área de cultivo de soja, para reduzir a intensidade da doença, a estratégia mais utilizada é o controle químico com fungicidas (Nascimento, 2018) de sítio-específicos pertencentes aos grupos químicos DMI, (inibidores da desmetilação) conhecidos como “triazóis”, QoI (inibidores de quinona externa) as “estrobilurinas” e SDHI (inibidores da enzima succinato desidrogenase) as “carboxamidas”, que atuam contra um único ponto da via metabólica de um patógeno ou contra uma única enzima ou proteína (Godoy *et al.*, 2020a). Outros fungicidas, multissítios ou biológicos, também são empregados para o controle dessa doença (Godoy *et al.*, 2021).

As populações brasileiras de *P. pachyrhizi* têm apresentado resistência aos fungicidas triazóis – DMI (Schmitz *et al.*, 2014) e estrobilurinas - QoI (Klosowski *et al.*, 2016), já os fungicidas SDHI, são considerados de médio a alto risco para seleção de resistência em populações de patógenos de plantas (Simões *et al.*, 2018; BORBA, 2020).

Os SDHIs, do grupo carboxamida de segunda geração, foram registrados para o manejo de doenças da soja no Brasil em 2013 (MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Brasil. AGROFIT - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários, 2024). Os fungicidas pertencentes a esse grupo inibem especificamente a respiração mitocondrial, visando a succinato desidrogenase (enzima Sdh ou complexo II da cadeia respiratória) (Sierotzki; Scalliet, 2013; Klappach; Stammeler, 2019).

Isolados de *P. pachyrhizi* resistentes aos fungicidas SDHI surgiram na safra 2015/2016, os quais apresentaram mutação no gene SdhC, resultando na substituição de aminoácidos SdhC-I86F no local alvo (Müller; Stammler; May De Mio, 2021). Os isolados que carregam esta substituição, provavelmente são os responsáveis pelo aumento da frequência e rápida disseminação nos campos de soja em todo o país de 2015 a 2019 sob pressão de fungicidas (Mello *et al.*, 2021).

A fim de prolongar a vida útil dos fungicidas existentes (DMIs e Qols) para controle da ferrugem da soja, é necessário projetar estratégias anti-resistência inteligentes, evolutivas e eficazes para que os produtores e patologistas de extensão de soja, possam usar imediatamente a chegada de novos produtos no mercado (Corkley *et al.*, 2022).

Dentre as estratégias anti-resistência está o monitoramento da população do patógeno. Para isso, existe uma ferramenta simples, inteligente e atualmente utilizada, o coletor de esporos. Ele captura esporos fúngico transportado pelo ar, possibilita a identificação de inóculo na área de cultivo (Oliveira *et al.*, 2020) e, juntamente com a detecção baseada em DNA molecular do patógeno (Fraaije *et al.*, 2005), fornece a detecção precoce de alelos de resistência a fungicidas (Corkley *et al.*, 2022). Em um estudo com o fungo *Mycosphaerella graminicola*, foi desenvolvido o método que integra a captura de esporos com ensaios de PCR em tempo real, comprovando a eficácia do método (Fraaije *et al.*, 2005).

Estudar a aerobiologia do patógeno causador da ferrugem da soja, ou seja, a dinâmica do patógeno de planta transportado pelo ar, orientam na adoção das diretrizes anti-resistência tradicionais com base na racionalização do uso de fungicidas, como por exemplo, o momento e quantidade de pulverização que deve ser realizado. Um cronograma de pulverização de fungicida eficaz e baseado na aerobiologia para a redução das perdas de produtividade, tende a contribuir para a diminuição do impacto ambiental devido a diminuição de aplicação desnecessárias, aplicando somente quando houver o patógeno na área, e diminui também a pressão de seleção do fungo para resistência a fungicidas (Vicentini *et al.*, 2023).

Pesquisas em aerobiologia fúngica vêm sendo desenvolvidas em todo o mundo há mais de duas décadas. A associação de tecnologias moleculares com o uso de dados aerobiológicos fornece medidas quantitativas de inóculo do patógenos de plantas que está no ar na área de estudo, e em tempo real, melhorando o entendimento dos patossistemas, e conseqüentemente, o manejo de doenças (Van Der Heyden *et*

al., 2021). Além disso, a captura de esporos combinada com o qPCR (real quantitativo a reação em cadeia da polimerase) tem sido usada com sucesso para detectar e quantificar patógenos no ar, permitindo também o estudo de diferentes genótipos de patógenos, que podem estar relacionados à resistência a fungicidas (Fraaije *et al.*, 2005). A amostragem de esporos é útil para monitorar mudanças nas populações de patógenos de plantas e detectar inóculo fúngico antes da infecção. Portanto, usando um dispositivo de amostragem de esporos posicionado em duas áreas de cultivo de soja no Mato Grosso do Sul, juntamente com um ensaio de qPCR em tempo real, os objetivos do nosso estudo foram: 1) monitorar DNA fúngico específico de *urediniósporos* aerotransportados de *Phakopsora pachyrhizi* liberados nas safras de 2020 e 2022, e em 2021 tanto dentro quanto fora da safra, e 2) revelar a prevalência de alelos que conferem resistência do fungo aos grupos químicos Succinato Desidrogenase - SDHI (“carboxamidas”).

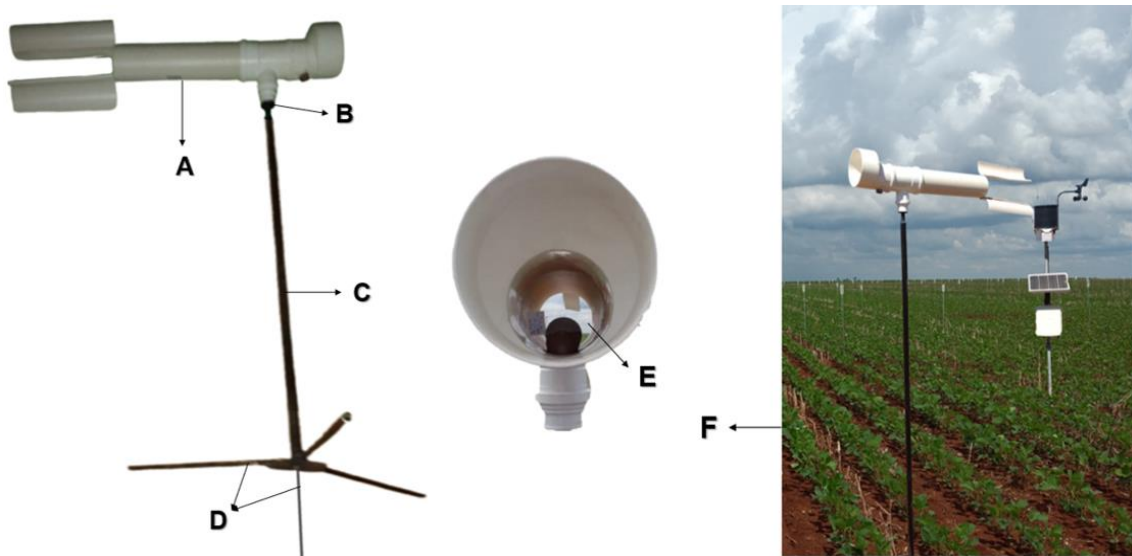
2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Monitoramento da dispersão aérea de esporos

O monitoramento da dispersão aérea de esporos do fungo *Phakopsora pachyrhizi* foi realizado por meio de coletores simplificados de esporos, feitos com base no modelo SIGA, desenvolvido por Igarashi em 1986 (Igarashi *et al.*, 1986). A sigla SIGA faz referência ao criador do equipamento, Dr. Seiji Igarashi. O coletor foi construído a partir de tubos, conexões e reduções de PVC acoplados entre si (Figura 1A) e sobre um rolamento (Figura 1B) no ápice de uma haste de ferro (figura 1C), com bases para serem fixadas no solo (Figura 1D) (Oliveira *et al.*, 2020).

O rolamento possibilitou que o coletor rotacionasse conforme a direção do vento, e os tubos permitiram a passagem livre do vento em seu interior. No interior do tubo havia um suporte no qual foi instalada uma lâmina de vidro. Nela, foi colado um pedaço de fita adesiva dupla face, onde os urediniósporos de *P. pachyrhizi* eram aderidos (Zoz; Gheller, 2015) (Figura 1E). Numa das extremidades da lâmina foi colada etiqueta de identificação, para o registro do nome do produtor, do município e da data que a lâmina foi inserida no coletor.

Figura 1 – Coletor de esporos (modelo SIGA)



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Nota: (A) Tubos, conexões e reduções de PVC acoplados entre si que permite a passagem livre do vento em seu interior; (B) Rolamento, possibilita que coletor rotacione conforme a direção do vento; (C) Haste de ferro que sustenta o coletor; (D) Bases que fixam o coletor no solo; (E) Posicionamento da lâmina de microscopia, com a fita adesiva de dupla face e a etiqueta de identificação, na curva de PVC (fixação no interior do equipamento); (F) Coletor de esporos instalado a campo. À direita do coletor de esporos havia uma estação meteorológica portátil.

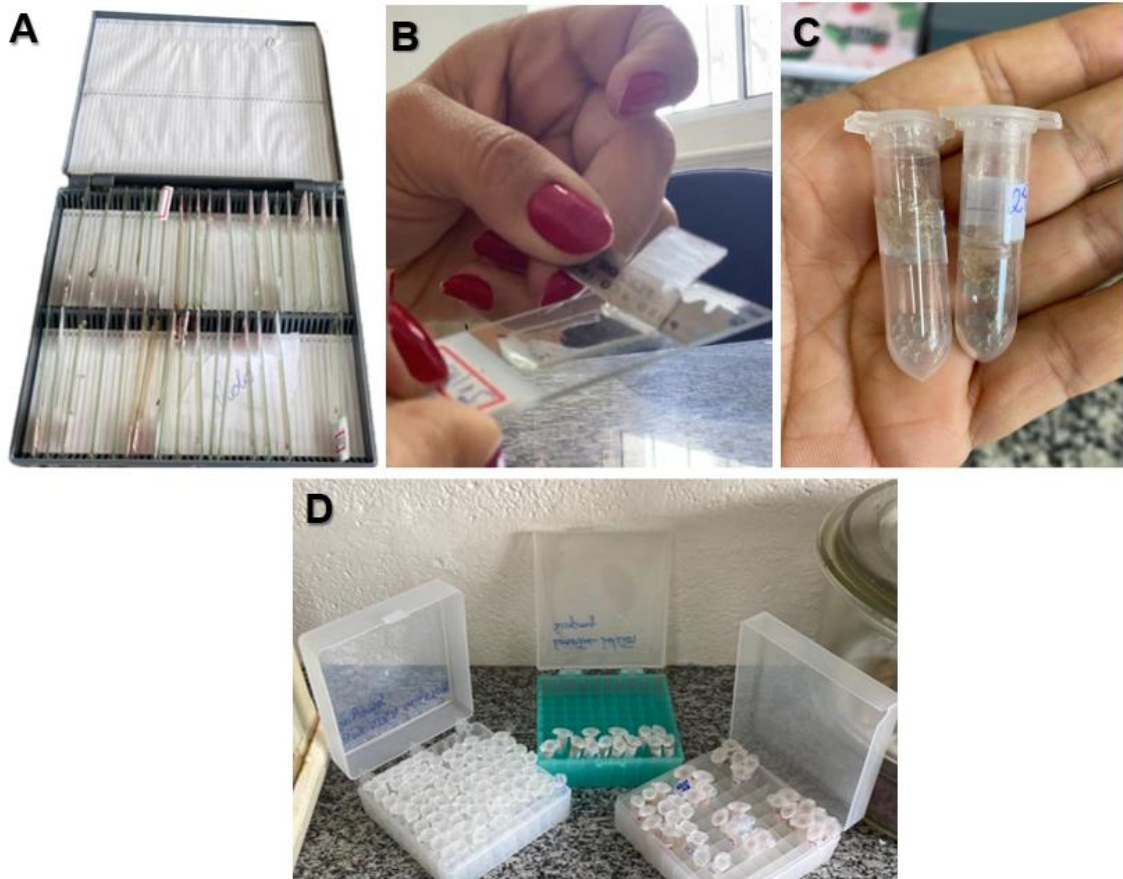
O coletor foi instalado na Fundação Chapadão (18°46' 26,1 "S; 52° 38' 47,2" O) em Chapadão do Sul, MS, e operou entre outubro de 2020 a janeiro de 2022. O coletor foi instalado em área de cultivo de soja, a uma altura de 1,5 metros do solo e próximo a uma estação meteorológica (Figura 1F). As lâminas de microscopia contendo amostras de esporos aéreos do patógeno foram coletadas semanalmente, colocadas em uma caixa porta lâminas de plástico (Figura 2A) e armazenadas em freezer - 20°C, até a extração de DNA.

2.2.2 Extração de DNA fúngico de amostras de esporos transportados pelo ar

Após a coleta dos esporos, com auxílio de uma lâmina de aço inox modelo Wilkinson Sword (Figura 2B), a fita adesiva contendo esporos fúngicos era retirada de cada lâmina de microscopia inserida no coletor SIGA, colocada dentro de tubos ependorf de 2 mL (Figura 2C) que continham 0,5 g de esferas de vidro estéreis (400 – 455 µm de diâmetro; Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA). Os tubos eram identificados

com o local e data da amostragem e armazenados em caixas de polipropileno (Figura 2C) em freezer a -20°C até o momento da realização da extração do DNA.

Figura 2 – Amostras de aerobiologia retiradas dos coletores de esporos SIGA, processamento pré-extração de DNA e seu armazenamento



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Legenda: (A) Caixa porta lâminas de plástico contendo amostras de aerobiologia de *Phakopsora pachyrhizi* obtidas no amostrador de esporos SIGA; (B) Retirada de fita adesiva contendo esporos fúngicos aéreos da lâmina de microscopia; (C) Tubos eppendorf de 2 mL contendo a amostra de esporos fúngicos em fita adesivas, e as esferas de vidro; (D) Caixa em polipropileno onde as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até a extração de DNA.

A extração de DNA fúngico constituiu-se em processo de múltiplas etapas, tendo sido realizada de acordo protocolo de Doyle, Jeff e Doyle, Jane (1990), cujo tampão de extração foi constituído por: CTAB (2%), NaCl (1,4 M), EDTA (20 mM), Tris- HCl (100 mM) pH 8,0, PVP (1%), 2 mercaptoetanol (0,2%).

Em cada tubo contendo fita adesiva e as esferas de vidro foram adicionados 750 μL de tampão de extração e incubou-se em banho-maria a 65°C por 45 minutos, agitando-se suavemente os tubos por inversão a cada 10 minutos. Após, adicionou-se

500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CAI) na proporção de 24:1 (v/v) para a desproteinização. Os tubos foram brevemente agitados em vórtex e então centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm em centrífuga não refrigerada. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para tubo novo devidamente identificado, nos quais adicionou-se 400 µL de isopropanol gelado e 1 µL do corante GlycoBlue™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Este último, serve como coprecipitante de ácido nucleico, isto é, o corante permite melhor visualização do sedimento de centrifugação contendo DNA colorindo-o levemente de azul. Os tubos foram agitados suavemente para precipitação do DNA e levados ao freezer por 2 horas.

Após esse tempo, para a recuperação do DNA, as amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente por 10 minutos a 10.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado para retirada do isopropanol. Para a retirada dos sais da amostra e para que o pellet de DNA soltasse da parede do tubo, foi adicionado 500 µL de álcool etílico a 70% em cada tubo, centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Esse procedimento com álcool etílico a 70% foi realizado duas vezes. Após, o pellet de DNA foi lavado uma vez com 500 µL de álcool etílico a 100% em cada tubo, centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm e descartado o sobrenadante. Os pellets de DNA visualizados por coprecipitação com GlycoBlue™, foram deixados secar ao ar dentro dos tubos, por duas horas em uma cabine de fluxo laminar.

Para ressuspender o DNA fúngico total obtido, foi acrescentado aos tubos 40 µL de Tris HCl [pH 7,4] e 4 µL de RNAase (110 µL mL). Em seguida, foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos, eliminando assim os RNAs.

A integridade e pureza das amostras de DNA, bem como a medição da concentração do ácido nucleico, foi verificada em espectrofotômetro, NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), utilizando 2 µL da solução Tris HCl [pH 7,4] para calibração do aparelho e 2 µL da amostra de cada tubo. Após as leituras, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

A concentração total de DNA obtida variou de 3,5 a 95,4 ng µL.

2.2.3 PCR em tempo real (RT qPCR) para detecção de alelos do gene *sdhC* de *P. pachyrhizi*

Antes da detecção quantitativa de alelos do gene *sdhC* de *P. pachyrhizi*, procedeu-se a amplificação por PCR convencional, de parte do gene (381 pb) para gerar

amplicons que foram usados como DNA modelo padrão para a calibração quantitativa da curva padrão nas reações de RT qPCR.

Foram selecionados DNAs de dois isolados de *P. pachyrhizi* para esta etapa inicial do experimento. As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 30 μ L contendo água ultrapura, 50 ng de DNA total, 0,1 μ M de cada primer (Tabela 1), 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de $MgCl_2$ 3,0 μ L de tampão 10 x e 1 U de Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). As amplificações foram realizadas em um termociclador Mastercycler® Nexus (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) usando as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 95°C por 30 s, 55°C de recozimento temperatura por 1 min (BORBA, 2020) e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 5 min.

Tabela 1 – *Primers* para amplificação por PCR do gene parcial SdhC de *P. pachyrhizi* utilizados para a curva padrão RT qPCR

Primers	Sequência (5' - 3')
SdhC-5224 F	CGA AGG CTA CAT ACA CTT C
SdhC-5223 R	GCG TCT CAG AAT CCA TAG

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: esses primers amplificam um fragmento SdhC de 381 pb de comprimento, segundo Borba (2020).

A amplificação positiva dos amplicons de PCR dos dois isolados de *P. pachyrhizi* foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os produtos de PCR foram purificados com o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) e armazenados para uso posterior. Para a calibração quantitativa das curvas padrão RT qPCR para cada um dos alelos SdhC, uma diluição serial de um *pool* do DNA modelo dos dois isolados foi preparada para obter as seguintes concentrações em um volume de reação final de 20 μ L: 90; 45; 9; 4,5; 2,25 e 0,9 $pg \cdot mL^{-1}$.

As reações de RT qPCR foram preparadas com um volume de reação final de 20 μ L, contendo 10 μ L de 1X Master Mix iTaq Probe (Bio Rad, Hercules, CA, EUA), 1 μ L de *forward primer* (iniciador adiante) a 300 nM, 1 μ L de *reverse primer* (iniciador reverso) a 300 nM, 1 μ L da sonda a 150 nM (Tabela 2), 3 μ L de água deionizada ultrapura e 4 ou 5 μ L de DNA modelo da amostra desconhecida. As reações foram realizadas utilizando-se termociclador para RT qPCR CFX96 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). As seguintes condições de amplificação foram aplicadas: 2 min a 95°C (2 - 5

segundos a 95 °C, 15 - 30 segundos a 60 °C) durante 40 ciclos. Cada reação de RT qPCR foi realizada em duplicata. Os resultados foram analisados utilizando o software CFX Maestro da Bio Rad.

Tabela 2 – Primers e sonda utilizados para detecção quantitativa por PCR em tempo real e quantificação da substituição I86F em amostras populacionais de *Phakopsora pachyrhizi*

Primers e sondas	Sequência (5' - 3')	Combinação de primers para detecção de alelos específicos*
Primers		
<i>Iniciador adiante</i>		
KES_2156_86F (A)	AAC AGC TAA CTT GGT ATT CCA GGT	SdhC 86F: A+C
KES_2155_86I (B)	AAC AGC TAA CTT GGT ATT CCA GGA	SdhC 86I: B+C
<i>Iniciador reverso</i>		
qPCR-sdhC R (C)	AAA CCA CCG GAT CAC TGA TGT	
<i>Sonda</i>		
Probe - sdhC	6-FAM-ACGGGTTGCGCTCTTACAGGAGGTATTC-BHQ1	

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Nota: *As combinações desses primers amplificam internamente um fragmento de TANTOS pb do gene sdhC, segundo Borba (2020), e permitem a detecção do alelo mutante (SdhC 86F, combinação A+C) ou do selvagem (SdhC 86I, combinação B+C), que confere resistência ou sensibilidade a fungicidas SDHI, respectivamente, em reações independentes.

Este experimento de detecção de qPCR nos permitiu quantificar a prevalência de cada um dos alelos do gene SdhC (codificação para a variante 86I do SdhC de tipo selvagem ou a variante SdhC 86F mutante), determinando assim as suas frequências relativas em populações de esporos de *P. pachyrhizi* em amostras temporais de aerobiologia.

2.2.4 Representação descritiva de séries temporais e análises estatísticas

Para sumarizar graficamente a série temporal das quantidades *P. pachyrhizi* detectadas por RT qPCR de amostras de aerobiologia contendo inóculo fúngico transportado pelo ar, foram utilizadas as seguintes bibliotecas do software estatístico R, *dplyr*, *lubridate*, *scales*, *gridExtra*, *ggthemes*, *ggplot2* e as funções *geom_line*, *geom_point* e *facet_wrap* (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Detecção de *Phakopsora pachyrhizi* em amostras de aerobiologia usando RT qPCR

O monitoramento por aerobiologia da flutuação temporal da dispersão aérea de esporos do fungo *P. pachyrhizi*, agente da ferrugem asiática da soja, foi realizada com auxílio de coletor de esporo SIGA. Esse monitoramento foi realizado para a determinação da prevalência relativa dos alelos selvagem I86 e mutante 86F do gene *sdhC* associados com sensibilidade ou resistência a fungicidas SDHI, em Chapadão do Sul, MS.

O DNA fúngico de *P. pachyrhizi* foi detectado em 61 das 81 amostras de aerossóis (75%) coletadas entre outubro de 2020 e janeiro de 2022. A flutuação temporal alélica foi representada pelas quantidades relativas dos alelos selvagem (86I) e mutante (86F) do gene *sdhC* individualmente, bem como pela soma total das quantidades destes alelos, que corresponde à detecção da população do patógeno na amostra (Figura 3 A, B e C).

Figura 3 – Quantidades de DNA gênico da *Phakopsora pachyrhizi* detectadas por PCR quantitativa em tempo real em amostras de aerossóis obtidas em coletores simplificados de esporos modelo SIGA, em Chapadão do Sul, MS, entre outubro de 2020 a janeiro de 2022, para detecção de alelo selvagem (I86) e alelo mutante (86F) *sdhC* (continuação)

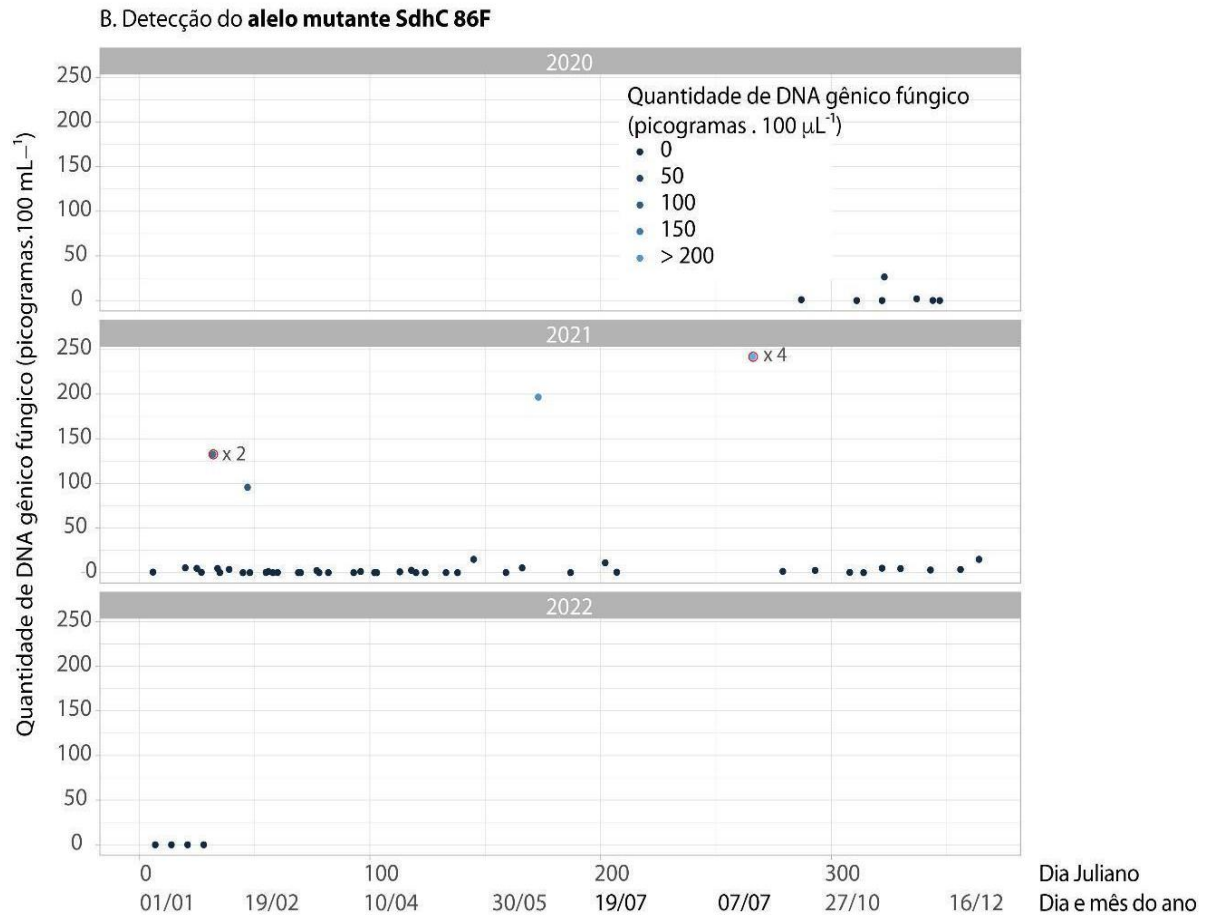


Figura 3 – Quantidades de DNA gênico da *Phakopsora pachyrhizi* detectadas por PCR quantitativa em tempo real em amostras de aerossóis obtidas em coletores simplificados de esporos modelo SIGA, em Chapadão do Sul, MS, entre outubro de 2020 a janeiro de 2022, para detecção de alelo selvagem (I86) e alelo mutante (86F) *sdhC* (continuação)

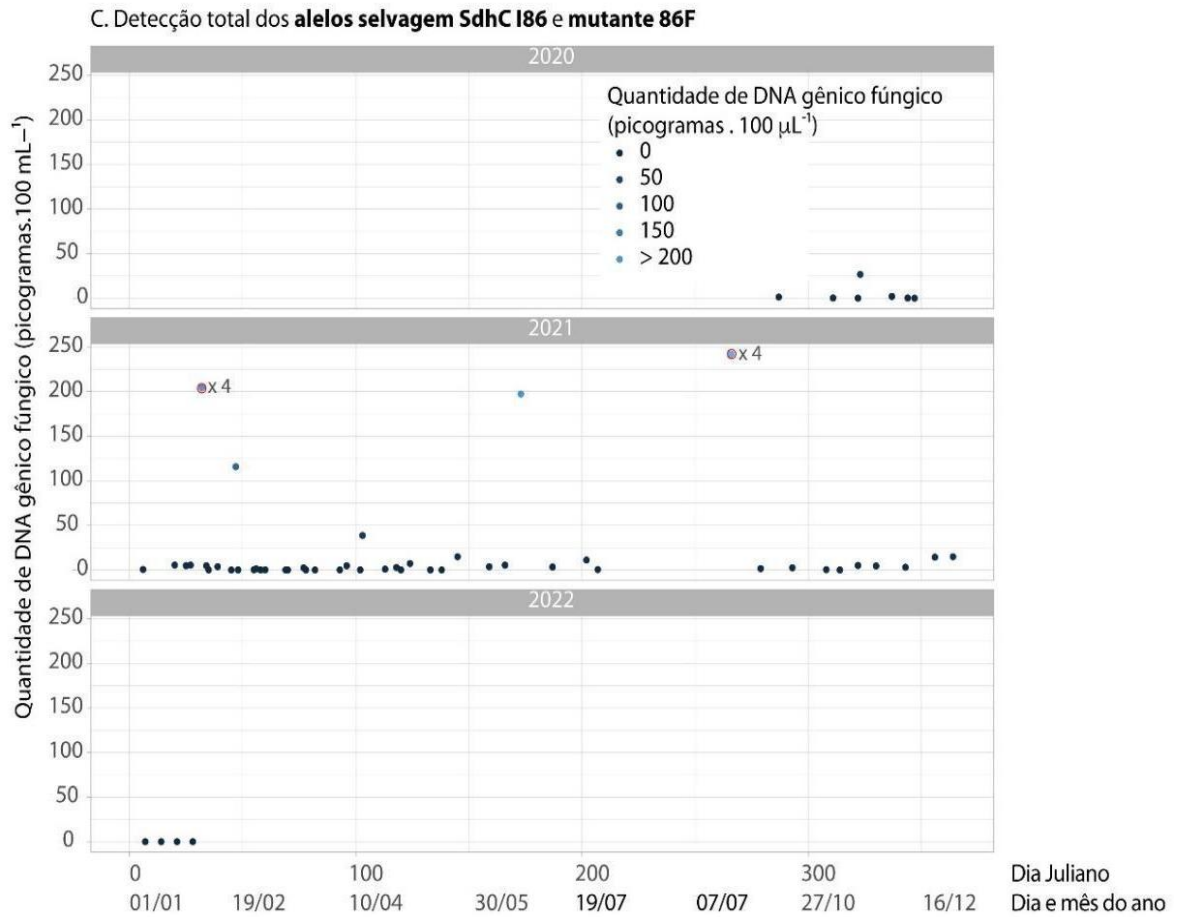
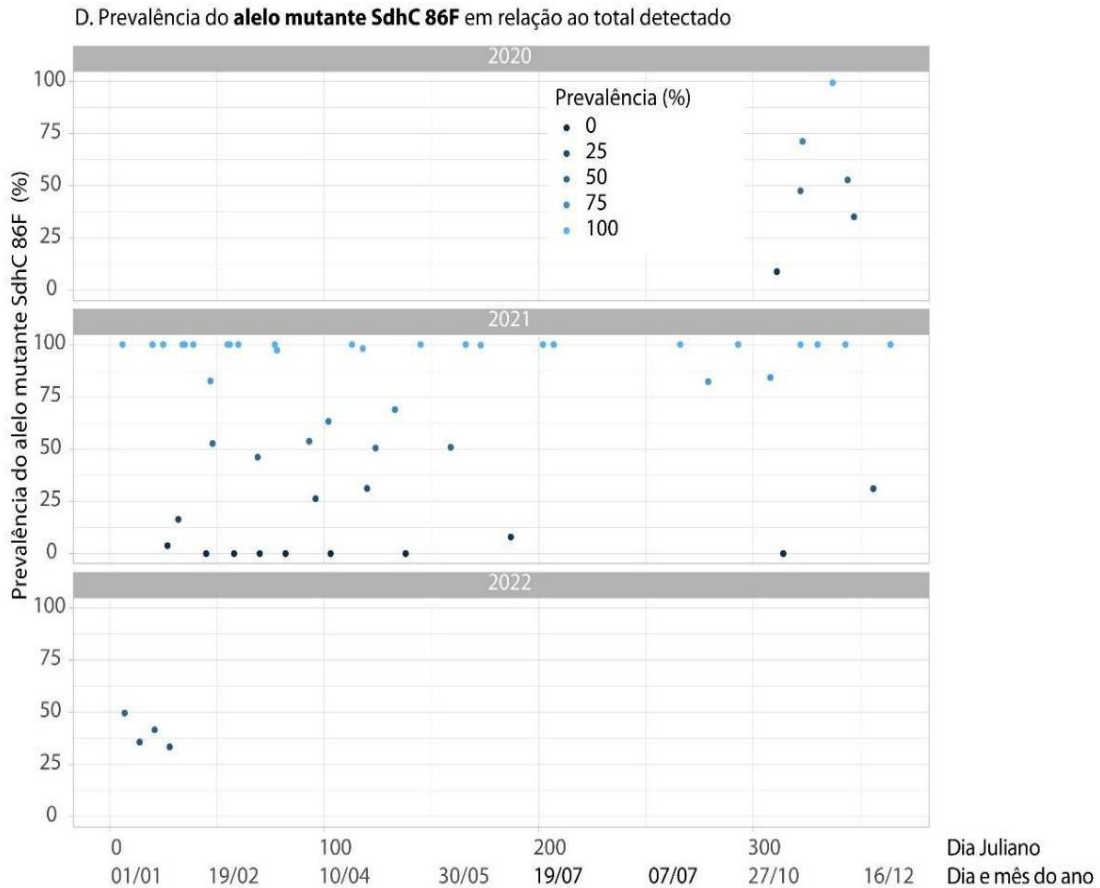


Figura 3 – Quantidades de DNA gênico da *Phakopsora pachyrhizi* detectadas por PCR quantitativa em tempo real em amostras de aerossóis obtidas em coletores simplificados de esporos modelo SIGA, em Chapadão do Sul, MS, entre outubro de 2020 a janeiro de 2022, para detecção de alelo selvagem (I86) e alelo mutante (86F) *sdhC* (conclusão)



Nota: *pontos seguidos de x2 ou x4 indicam valores correspondentes à $\frac{1}{2}$ ou a $\frac{1}{4}$ do total detectado, para melhor representação gráfica da amplitude de detecção temporal do patógeno.

A quantidade média do alelo selvagem (I86) do gene *sdhC* de *P. pachyrhizi* foi de 11,1 picogramas $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ em todo o período analisado. Detectou-se a maior quantidade de DNA, de 552,2 $\text{pg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ em fevereiro de 2021, e a menor quantidade detectada foi de 0,0009 pg em março de 2021, que esteve abaixo da linha de base de 0,09 $\text{pg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$, correspondente à menor concentração na curva padrão (Figura 3A).

A maior quantidade detectada do alelo mutante *sdhC* (86F) ocorreu em setembro de 2021, quantificada em 967,9 $\text{pg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$, seguida por quantidades de 265,0 e 196,6 $\text{pg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ nos meses de fevereiro e junho do mesmo ano (Figura 3B).

A menor quantidade detectada de alelo mutante ao longo dos períodos analisados (10/2020 a 01/2022), foi de 0,01 $\text{pg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$. Apesar dessas quantidades mínimas detectadas de alelo mutante (Figura 3B), nas amostras subsequentes a quantidade

de DNA do alelo mutante oscilou para quantidades maiores, indicando flutuação na prevalência alélica ao longo do tempo (Figura 3A e B).

O total de alelos selvagem e mutante também foi determinado, com base na soma das frequências individuais de cada um dos alelos. Com base nestas estimativas, a quantidade média de DNA gênico da *P. pachyrhizi* em $100 \mu\text{L}^{-1}$ de amostra de DNA foi de 39,6 picogramas. O total de $967,9 \text{ pg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ de DNA total foi a maior quantidade detectada [setembro de 2021] em todo o período analisado, enquanto a menor quantidade detectada foi $0,02 \text{ pg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ de DNA alvo (Figura 3C).

Quanto à prevalência do alelo mutante na área, houve flutuação entre 0 a 100% ao longo do período analisado, com picos de 100% ocorrendo praticamente em todos os meses, inclusive no período de pousio (vazio sanitário) na entressafra (Figura 3D).

2.4 DISCUSSÃO

Este se tratou de estudo inédito de aerobiologia do fungo da ferrugem da soja, em uma importante região produtora da cultura, Chapadão do Sul, MS, entre outubro de 2020 e janeiro de 2022, com objetivo de detectar a flutuação temporal na prevalência do alelo mutante 86F do gene *sdhC*, responsável por conferir resistência a fungicidas SDHI (Müller; Stammler; May De Mio, 2021). O estudo foi conduzido com o auxílio de uma ferramenta de baixo custo para coleta de amostras de aerossóis contendo uredosporo de *P. pachyrhizi* transportados pelo ar. Para detecção alélica do DNA gênico alvo do fungo e quantificação específica, utilizou-se RT qPCR.

Em todo o período amostrado detectou-se tanto o alelo selvagem (86I) quanto o alelo mutante do gene *sdhC* (86F) que confere resistência do fungo a fungicidas do grupo químico SDHI (Müller; Stammler; May De Mio, 2021). A detecção e a prevalência do alelo mutante em Chapadão do Sul são indícios que populações de esporos de *P. pachyrhizi* com resistência a SDHI circulam na região, uma vez que a resistência a estes fungicidas foi relatada como pervasiva no país (Müller; Stammler; May De Mio, 2021).

O monitoramento direto do inóculo aéreo do patógeno da ferrugem da soja usando coletores de esporos simples ou sofisticados, em combinação com a detecção molecular de alelos ou variantes gênicos associados com resistência a fungicidas, é considerado útil para revisões precisas dos riscos de epidemias da doença causadas por populações resistentes a fungicidas, como documentado em outros patossistemas (Fraaije *et al.*, 2005; Van Der Heyden *et al.*, 2021; Vicentini *et al.* 2023).

Preconiza-se que o monitoramento contínuo do inóculo de *P. pachyrhizi* transportados pelo ar (isto é, a aerobiologia do patógeno) na área de cultivo antes mesmo da manifestação sintomática da doença nas plantas, possibilita o manejo técnico e econômico da ferrugem, racionalizando-se a tomada de decisão em pulverizar, especialmente sobre quando e quais fungicidas utilizar (West *et al.*, 2008; Godoy *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2020). Em consequência, o manejo da ferrugem se tornaria mais assertivo, evitando-se pulverizações preventivas, desnecessárias e com moléculas fungicidas ineficazes (West *et al.*, 2008; Ceresini *et al.* 2024). Poderia, como consequência, auxiliar na implementação de um programa de manejo integrado da ferrugem visando diminuir a pressão de seleção para resistência, bem como diminuir o impacto

ambiental em decorrência do uso intensivo de fungicidas nos agroecossistemas (West *et al.*, 2008; Ceresini *et al.* 2024).

Um aspecto peculiar deste nosso estudo foi a detecção do inóculo da *P. pachyrhizi* durante o período de vazio sanitário, na ausência da cultura da soja na área. Hipotetizamos que isso pode ter ocorrido devido ao fluxo gênico do patógeno à longa distância (Twizeyimana *et al.*, 2011), onde o inóculo do fungo pode ter sido disperso e atingido a área de cultivo por correntes de ar, uma vez que a ferrugem ocorre também em países vizinhos que não praticam o vazio sanitário de forma regular e regulamentada como o Brasil (Henning *et al.*, 2014). De fato, na existência de hospedeiro suscetível adequado, o fungo *P. pachyrhizi* pode sobreviver e se reproduzir, liberando quantidades elevadas de inóculo aéreo durante todo o ano (Hartman *et al.*, 2015).

Nesse sentido, por possuir condições climáticas ideais para o desenvolvimento da doença e para evitar continuidade espacial e temporal do cultivo da soja praticamente durante todo o ano, o Brasil e o Paraguai praticam o vazio sanitário, regulamentado por leis federal e estadual (Brasil, 2022; SENAWE, 2011). Esse período de vazio sanitário consiste em restringir o cultivo de soja, que é o principal hospedeiro do patógeno (Godoy *et al.*, 2020a), para que os uredósporos de *P. pachyrhizi* que permanecerem no campo após a colheita percam a viabilidade na ausência de plantas hospedeiras voluntárias, uma vez que se trata de patógeno biotrófico obrigatório (Consórcio Antiferrugem, 2024b). Entretanto, alguns países que fazem divisa com o Brasil, como a Argentina e Bolívia, produzem soja no intervalo das principais safras, não realizam o vazio sanitário, proporcionando fontes permanentes de inóculo do fungo da ferrugem contribuindo para a dispersão (Li *et al.* 2010; Twizeyimana *et al.*, 2011; Yorinori, 2021c).

Por sua vez, há relatos de que o feijão kudzu (*Pueraria lobata*) é hospedeiro secundário importante do fungo *P. pachyrhizi* podendo contribuir inóculo primário para epidemias em soja (Yorinori, 2021c). Por exemplo, em novembro de 2021, foram constatados focos de ferrugem em feijão kudzu e em plantas voluntárias de soja nas áreas de Capitán Meza e Pirapó, no departamento de Itapúa, no Paraguai. Esse foco foi detectado pelo *Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas* - SENAWE daquele país (Consórcio Antiferrugem, 2021a).

Conforme a legislação vigente, no estado de Mato Grosso do Sul, após o pousio, a semeadura da soja pode ser iniciada a partir de 16 de setembro (BRASIL.

MAPA/DAS, 2022). Contudo, naturalmente, os produtores esperam até as primeiras chuvas após o período de estiagem para iniciarem a semeadura (Silva Neto; Moreira; Silva, 2010). Na área de estudo, as primeiras semeaduras de soja iniciaram em 20 de outubro de 2020. Por sua vez, detectou-se a prevalência do alelo mutante do gene *sdhC* que confere resistência a SDHIs em *P. pachyrhizi*, já entre outubro e dezembro de 2020 (Figura 3A e B e Apêndice A). Essa elevada prevalência do alelo mutante do gene *sdhC*, mesmo antes do estabelecimento da cultura na área (ou ainda nos primórdios de desenvolvimento), do início das epidemias de ferrugem, e sem que pulverizações de fungicidas tivessem sido realizadas, também pode ser explicada por aporte de inóculo do patógeno com resistência a fungicidas SDHI por fluxo gênico decorrente de dispersão aérea de uredósporos de outras regiões, como anteriormente explanado (Twizeyimana *et al.*, 2011).

A outra peculiaridade detectada em nosso estudo, diz respeito à flutuação da prevalência do alelo mutante para resistência a SDHI, oscilando entre 0 a 100% ao longo do período analisado, com picos de 100% ocorrendo praticamente em todos os meses do ano (Figura 3D). Esta oscilação, na safra, provavelmente esteve relacionada com a dinâmica do manejo químico de doenças da soja na área experimental de cultivo, incluindo-se a ferrugem. Ou seja, o uso de moléculas fungicidas SDHI pode ter contribuído para a seleção positiva da variante *SdhC* 86F que confere resistência ao fungicidas em *P. pachyrhizi*, enquanto o uso de outras moléculas eficazes contra ferrugem, especialmente os fungicidas multissítios, pode ter selecionado negativamente a mutação para resistência, favorecendo a sobrevivência dos indivíduos selvagens sensíveis a SDHI nos meses de fevereiro e abril de 2021.

É também possível que urediniósporos de *P. pachyrhizi* com a variante mutante *SdhC* 86F capturados pelo coletor de esporos, tenha se originado de áreas vizinhas submetidas à pulverização com fungicidas SDHI, ou ainda de lavouras semeadas mais cedo na região, logo após o término do vazio sanitário. Essas lavouras tendem a multiplicar o fungo no final do ciclo da cultura, em função do decréscimo do residual dos produtos favorecendo a disseminação desse inóculo para outras lavouras adjacentes e mais novas em regiões vizinha (EMBRAPA, 2015; Godoy *et al.*, 2020a)

Para dar suporte à afirmação sobre a influência do manejo químico de doenças da soja sobre a dinâmica da dispersão de inóculo de *P. pachyrhizi* com resistência a fungicidas SDHI, consultamos e tabulamos o portfólio de fungicidas usados na Fundação Chapadão, durante o período experimental. Por exemplo, para manejo da

mancha alvo, foram realizadas pulverizações calendarizadas de fungicidas aos 44, 57 e 71 dias após a emergência (DAE) da soja, em 08 e 21/12/2020 e em 04/01/2021 respectivamente. Foram utilizados fungicidas de diferentes grupos químicos, incluindo moléculas do grupo multissítio (como o clorotalonil, o mancozebe e o oxicloreto de cobre), que possuem baixo risco para resistência, pois atuam em diversos sítios metabólicos nos fitopatógenos (Ceresini *et al.*, 2024; FRAC, 2019; Godoy *et al.* 2020a) (Tabela 3). Todos esses fungicidas registrados para mancha alvo e outras manchas foliares são também registrados para manejo da ferrugem (Brasil, 2024).

Tabela 3 – Ingrediente ativo com seus respectivos grupos químico, concentração ($\text{g}\cdot\text{L}$ ou kg^{-1}) e dose comercial (mL ou $\text{g pc}\cdot\text{ha}^{-1}$) utilizados em manejo da mancha alvo na área. Chapadão do Sul, MS, safra 2020/21.

Ingrediente ativo	Grupo químico	Concentração	Dose
Piraclostrobina + Fluxapiroxade*	Estrobilurina + Carboxamida (SDHI)	333 + 167	350
Trifloxistrobina + Protiokonazol + Bixafem*	Estrobilurina+ Triazolinthione + Carboxamida (SDHI)	150 + 175 + 125	500
Protiokonazol + Fluxapiroxade*	Triazolinthione + Carboxamida (SDHI)	280 + 200	300
Clorotalonil + Fluindapyr*	Isoftalonitrila + Pirazol carboxamida (SDHI)	500 + 40	2400
Mancozebe	Alquilenobis (ditiocarbamato)	800	1500
Mancozebe +Oxicloreto de Cobre	Alquilenobis (ditiocarbamato) + Inorgânico	300+201,6	1000
Fluxapiroxade* + Oxicloreto de Cobre	Carboxamida (SDHI) +Inorgânico	50+ 420	1200

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Dados fornecidos pela Fundação Chapadão. *Exemplos de molécula fungicida SDHI.

Especificamente para manejo da ferrugem asiática da soja, foram realizadas pulverizações calendarizadas de fungicidas aos 45, 58, 73 e 86 DAE em 07 e 21/01/2021 e em 05 e 18/02/2021, respectivamente, com princípios ativos dos seguintes grupos químicos: QoI estrobirulinas, DMI triazóis e SDHI carboxamidas, que agem em sítios específicos do metabolismo fúngico, atuando contra uma única enzima ou proteína, em apenas um único ponto da via metabólica de um patógeno [e portanto de maior risco para resistência] (Ceresini *et al.* 2024; Godoy *et al.* 2020a), e também os multissítios, Alquilenobis (ditiocarbamato, mancozeb), Isoftalonitrila (clorotalonil) e inorgânico (oxicloreto de cobre) (Tabela 4).

Tabela 4 – Ingrediente ativo com seus respectivos grupos químico, concentração ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou kg^{-1}) e dose comercial (mL ou $\text{g}\cdot\text{pc}\cdot\text{ha}^{-1}$), AACPD média e porcentagem de eficiência do controle (E%), utilizados no manejo ferrugem asiática da soja. Chapadão do Sul, MS, safra 2020/21.

Ingrediente Ativo	Grupo químico	Concentração	Dose	AACPD	E%
Picoxistrobina+Ciproconazol	Estrobilurina+Triazol	200+80	300	338,8	36,1
Clorotalonil+Tebuconazol	Isoftalonitrila+Triazol	450+50	2500	284,9	46,2
Fluxapiroxade +Oxicloreto de cobre	Carboxamida + Inorgânico	50 +420	1200	329,3	37,9
Fluxapiroxade+Protioconazol	Carboxamida+Triazolinthione	200+280	300	284,3	46,4
Azoxistrobina+Benzovindiflupyr	Estrobilurina+Pirazol carboxamida	300+150	200	443,2	16,4
Picoxistrobina+Benzovindiflupyr	Estrobilurina+Pirazol carboxamida	100+50	600	459,6	13,3
Piraclostrobina+Fluxapiroxade	Estrobilurina+Carboxamida	333+167	300	365,9	30,9
Epoxiconazol+Fluxapiroxade +Piraclostrobina	Triazol+Carboxamida +Estrobilurina	50+50 +81	800	386,5	27,1
Bixafem+Protioconazol +Trifloxistrobina	Carboxamida+Triazolinthione +Estrobilurina	125+175 +150	500	265,5	49,9
Picoxistrobina+Tebuconazol +Mancozebe	Estrobilurina+Triazol +Alquilenobis (ditiocarbamato)	26,66+33,33 +400	2500	292,1	44,9

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Dados fornecidos pela Fundação Chapadão.

Os primeiros sintomas visíveis da doença na soja ocorreram apenas no estádio R5.3, três dias antes da última aplicação com fungicidas (15/02/2021). Entretanto, em Mato Grosso do Sul a doença já vinha sendo constatada desde janeiro de 2021 (Consórcio Antiferrugem, 2021b).

Embora essas pulverizações de fungicidas na área experimental normalmente resultam em redução da taxa de progresso da ferrugem (área abaixo da curva de progresso da doença, AACPD), a eficácia do manejo químico foi de moderada a baixa (Tabela 4). A maior eficácia detectada foi de 49,9% para a formulação contendo os ingredientes ativos Bixafem (SDHI) + Protioconazol (DMI triazol) + Trifloxistrobina (Qol estrobilurina) ($125+175+150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), porém ainda abaixo de 50%. Por sua vez, é importante salientar que fungicidas DMI triazóis e Qol estrobilurinas presentes nas misturas ou co-formulações citadas (Tabela 4) são considerados de baixa eficácia para manejo da ferrugem em função da resistência generalizada a estas moléculas no país

na última década (Schmitz *et al.*, 2014; Klosowski *et al.*, 2016). Dessa forma, uma mistura dessas moléculas com fungicidas SDHI pode ter o mesmo efeito de pulverizar fungicidas SDHIs isoladamente, do ponto de vista de elevada pressão de seleção sobre as populações do patógeno (Ceresini *et al.* 2024).

Já que as co-formulações ou misturas de fungicidas SDHI com DMI triazóis ou QoI estrobilurinas podem ser problemáticas, recomenda-se a adoção de misturas com fungicidas multissítios como de medida importante para manejo da resistência aos fungicidas SDHIs. Isso considerando tanto a mutação SdhC 86F já prevalente no país, quanto para que novas mutações conferindo resistência aos SDHIs não venham a emergir nas populações de *P. pachyrhizi* (FRAC, 2018; Godoy *et al.*, 2020b; Ceresini *et al.*, 2024). Nas últimas décadas, nenhum caso de resistência de campo contra fungicidas multissítios foi relatado (Mcgrath, 2004; FRAC, 2018).

Assim, considera-se que os fungicidas multissítios oferecem a possibilidade de associação a fungicidas sítio-específicos ou alternância com fungicidas de sítio único que apresentam risco de resistência média a alta, por proteger e prolongar a vida útil desses fungicidas que são altamente eficazes, oferece suporte a fungicidas de sítios-específico para serem ainda mais eficientes, e, além disso, os fungicidas multissítios fornecem níveis e espectro adicionais no manejo de doenças (FRAC, 2018; Godoy *et al.*, 2020b; Ceresini *et al.*, 2024).

Em suma, concluiu-se que o monitoramento da aerobiologia do patógeno da ferrugem da soja, com auxílio de coletor simplificado de esporos modelo SIGA é uma excelente ferramenta, quando associada à detecção molecular, por RT qPCR, do patógeno e mutações para resistência a fungicidas, para manejo integrado e sustentável da doença no campo. Se institucionalizado, poderia ser incorporado em sistemas de alerta aos produtores, extensionistas e pesquisadores sobre a presença de inóculo fúngico relevante para início das epidemias de ferrugem, ainda na ausência de sintomas nas plantas hospedeira (Ceresini *et al.*, 2024). Isso auxiliaria sobremaneira no planejamento racional das pulverizações de fungicidas para o manejo da ferrugem asiática, evitando-se aplicações preventivas desnecessárias.

O coletor de esporos SIGA já vem sendo utilizado por muitos produtores na região, onde o nível de inóculo é monitorado com base na contagem de esporos por microscopia ótica em laboratório com pessoas qualificadas para esse tipo de identificação. Contudo, o sucesso desta pesquisa foi, de fato, conseguirmos, a partir de uma

ferramenta tão rústica e simples, extrair informação molecular relevante para o manejo sustentável da ferrugem da soja.

2.5 CONCLUSÃO

O monitoramento da dispersão do inóculo do patógeno com coletor simplificados de esporos, associado à detecção molecular por RT qPCR foi útil na detecção e quantificação da flutuação temporal populacional de *Phakopsora pachyrhizi*, bem como na detecção da prevalência do alelo mutante do gene *sdhC*, que confere resistência a fungicidas SDHI, com aplicações práticas para o manejo racional da doença com fungicidas.

REFERÊNCIAS

- AKAMATSU, H. *et al.* Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **General Plant Pathology**, Kudan-kita, v. 79, p. 28-40, 2013.
- BARRO, J. P. *et al.* Performance of dual and triple fungicide premixes for managing soybean rust across years and regions in Brazil: a meta-analysis. **Plant Pathology**, Heidelberg, v. 70, n. 8, p. 1920-1935, 2021.
- BORBA, J. P. **Does the I86F mutation of succinate dehydrogenase subunit c increase fungicide resistance and have a fitness cost in asian soybean rust (*Phakopsora Pachyrhizi*)?** 2020. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências/Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília, DF: AGROFIT, 2024. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 4 fev. 2024
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária – MAPA. Portaria SDA Nº 516, de 1º de fevereiro de 2022. Estabelece os períodos de vazio sanitário vegetal para a cultura da soja, em nível nacional para o ano de 2022. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24. ed., 03 fev. 2022. Seção 1, p. 18. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-sda-n-516-de-1-de-fevereiro-de-2022-377895004>. Acesso em: 25 ago. 2023.
- CERESINI, P. C. *et al.* Strategies for managing fungicide resistance in the Brazilian tropical agroecosystem: Safeguarding food safety, health, and the environmental quality. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 49, n. 1, p. 36-70, 2024.
- COMITÊ DE AÇÃO A RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS – FRAC. **Importance of multisite fungicides in managing pathogen resistance**. Holambra: FRAC, 2018. Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/statement-on-multisite-fungicides/frac-statement-on-multisite-fungicides-2018.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2024.
- COMITÊ DE AÇÃO A RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS – FRAC. **Recomendações para o uso de triazois e triazolintione no manejo da ferrugem asiática da soja**. Holambra: FRAC, 2019. Disponível em: https://www.frac-br.org/_files/ugd/85b1d3_7ac3ab6d8b904f6e8aec5d654b5b7f88.pdf. Acesso em: 26 jul. 2023.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Ferrugem em números: safra 2020/2021**. 2021b. <http://www.consorcioantiFerrugem.net/#/numeros>. Acesso em 30 de jan. 2024.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Mapa da dispersão**. 2024a. Disponível em: <http://www.consorcioantiFerrugem.net/#/main>. Acesso em: 10 jan. 2024.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Monitoramento no Paraguai e Brasil identificam Ferrugem em soja voluntária, kudzu e coletores**. 2021a. Disponível em: <http://www.consorcioantiFerrugem.net/#/main>. Acesso em: 30 jan. 2024.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Vazio sanitário e regulamentação de janela de semeadura**: normativas Brasil e Paraguai. 2024b. Disponível em: <http://www.consorcioantiFerrugem.net/#/conteudos/view/14>. Acesso em: 30 jan. 2024.

CORKLEY, I. *et al.* Fungicide resistance management: Maximizing the effective life of plant protection products. **Plant Pathology**, Heidelberg, v. 71, v.1, p. 150-169, 2022.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Munich, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. O genoma altamente complexo do fungo *P. pachyrhizi* causador da mais devastadora doença da soja foi decifrado por um consórcio único de empresas públicas e privadas. **Nota Técnica**. Londrina: Embrapa Soja, 2019. Disponível em: https://www.embrapa.br/documents/1355202/1529289/Nota_t%C3%A9cnica_Genoma_Ferrugem.pdf/804822e1-b87f-99b8-1db0-2417d91f8324. Acesso em: 10 jan. 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Risco do surgimento e do aumento de população resistente a fungicida do fungo causador da Ferrugem-asiática da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 2 p. Nota técnica. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/Ferrugem/notastecnicas>. Acesso em: 4 fev. 2024.

FRAAIJE, B. A. *et al.* Role of ascospores in further spread of Qol-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 933-941, 2005.

GODOY, C. V. *et al.* **Eficiência de fungicidas multissítios no controle da Ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2019/2020**: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2020b. 16 p.

GODOY, C. V. *et al.* **Ferrugem-asiática da soja: Bases para o manejo da doença e estratégias antirresistência**. Londrina: Embrapa Soja, 2020a. 39 p.

GODOY, C. V. *et al.* Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 51, n. 5, p. 407-421, 2016.

GODOY, C. V. *et al.* **Boas práticas para o enfrentamento da Ferrugem-asiática da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2017. 6 p.

GODOY, C. V. *et al.* **Eficiência de fungicidas multissítios e produto biológico no controle da Ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2020/2021**: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2021. 20 p.

GUPTA, Y. K. *et al.* Major proliferation of transposable elements shaped the genome of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Nature Communications**, London, v.14, n.1835, p. 1-16, 2023.

HARTMAN, G. L. *et al.* **Compendium of soybean diseases and pests**. 15th. ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2015. 201 p.

HENNING, A. A. *et al.* **Manual de identificação de doenças de soja**. 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 76 p.

IGARASHI, S. *et al.* *Pyricularia* sp. em trigo. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Heidelberg, v. 11, n. 2, p. 351, 1986.

KLAPPACH, K.; STAMMLER, G. Resistance of plant pathogens to Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) fungicides (FRAC Code 7). *In*: KLAPPACH, K.; STAMMLER, G. (ed.) **Fungicide resistance in North America**: Mycology. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2019. p. 85–95.

KLOSOWSKI, A. C. *et al.* Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest Management Science**, Oxford, v. 72, n. 6, p. 1211-1215, 2016.

LI, X. *et al.* The uniqueness of the soybean rust pathosystem: An improved understanding of the risk in different regions of the world. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p. 796–806, 2010.

McGRATH, M. T. **What are fungicides? The plant health instructor**. 2004. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/Fungicides.aspx>. Acesso em: 31 ago. 2023. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.

MELLO, F. E. *et al.* Sensitivity Assessment and SDHC-I86F mutation frequency of *Phakopsora Pachyrhizi* populations to Benzovindiflupyr and Fluxapyroxad fungicides from 2015 to 2019 in Brazil. **Pest Management Science**, Oxford, v.77, n. 10, p. 4331-4339, 2021.

MÜLLER, M. A.; STAMMLER, G.; MAY DE MIO, L. L. Multiple resistance to DMI, Qol and SDHI fungicides in field isolates of *Phakopsora Pachyrhizi*. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 145, p.105618, 2021.

NASCIMENTO, F. G. **Controle de doenças em soja com diferentes manejos e momentos de aplicação de fungicidas baseados no índice de área foliar**. 2018. 39 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

OLIVEIRA, G. M. *et al.* **Coletor de esporos**: descrição, uso e resultados no manejo da Ferrugem-asiática da soja. Londrina: IDR-Paraná e Embrapa, 2020.

PAUL, C. *et al.* First report of *Phakopsora pachyrhizi* adapting to soybean genotypes with Rpp1 or Rpp6 rust resistance genes in field plots in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 10, 1379–1379, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing. 2020. Disponível em: <http://www.r-project.org/index.html>. Acesso em: 5 jan 2024.

SCHMITZ, H. K. *et al.* Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards Quinone-outside-inhibitors and Demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, Oxford, v. 70, p. 378–388, 2014.

SERVICIO NACIONAL DE CALIDAD Y SANIDAD VEGETAL Y DE SEMILLAS – SENAVE. **Resolución Nº 071; la Ley Nº 123/91 y la Ley Nº 2.459/04.** “Por la cual se establece un período de pausa fitossanitaria posterior a una zafra del cultivo de soja, que deberá implementarse a fin de minimizar los efectos del ataque de la roya asiática de la soja (*Phakopsora pachyrhizi*)”. Assunción, 11 feb. 2011. Disponível em: http://acacia.cnpso.embrapa.br:8080/cFerrugem_files/1053819122/resolucion_071.pdf. Acesso em: 25 ago. 2023.

SIEROTZKI, H.; SCALLIET, G. A Review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor fungicides. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n.9, p. 880–887, 2013.

SILVA NETO, S. P.; MOREIRA, C. T.; SILVA, S. A. **Plantio da soja na época certa.** 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/75715/1/art-046.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2024.

SIMÕES, K. *et al.* First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora Pachyrhizi*. **Plant Diseases and Protection**, Heidelberg, v. 125, p. 21–26, 2018.

TWIZEYIMANA, M. *et al.* Genetic structure and diversity of *Phakopsora Pachyrhizi* isolates from soyabean. **Plant Pathology**, Heidelberg, v. 60, n. 4, p.719–729, 2011.

VAN DER HEYDEN, H. *et al.* Monitoring airborne inoculum for improved plant disease management. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 41, n. 40, p.1-23, 2021.

VICENTINI, S. N. C. *et al.* Aerobiology of the wheat blast pathogen: Inoculum monitoring and detection of fungicide resistance alleles. **Agronomy**, Basel, v. 13, n. 5, p. 1238, 2023.

WEST, J. S. *et al.* PCR to Predict Risk of Airborne Disease. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 8, p.380–387, 2008.

YORINORI, J. T. Development and Economic Importance. *In*: YORINORI, J. T. **Soybean rust: lessons learned from the pandemic in Brazil.** Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2021a. p. 1-13.

YORINORI, J. T. Hosts and sources of inoculum of soybean rust. *In*: YORINORI, J. T. **Soybean rust: lessons learned from the pandemic in Brazil.** Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2021c. p. 87-91,

YORINORI, J. T. Progresso da doença e fatores que afetam o desenvolvimento da Ferrugem da soja. *In*: YORINORI, J. T. **Soybean rust**: lessons learned from the pandemic in Brazil. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2021b. p. 69-74.

ZOZ, D.; GHELLER, J. A. Manejo químico da Ferrugem asiática utilizando o coletor de esporos como indicativo do momento ideal de controle da Ferrugem na cultura da soja. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. edição especial, p.11-17, 2015.

APÊNDICE

APÊNDICE A – FLUTUAÇÃO ALÉLICA DA POPULAÇÃO DE *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*, COM DATA DA COLETA, QUANTIDADE DE PICOGRAMA (PG 100 ML⁻¹) ALELO MUTANTE 86F E SELVAGEM I86 SEPARADO E A SOMA DOS DOIS E PROPORÇÃO DE ALELO MUTANTE 86F. CHAPADÃO DO SUL, MS

	MESES	DATA DAS AMOSTRAS	ALELO MUTANTE (86F)	ALELO SELVAGEM (I86)	TOTAL MUTANTE (86F) + SELVAGEM (I86)	PROPORÇÃO DE ALELO MUTANTE (86F)	ORDEM DAS AMOSTRAS
		01/10/2020					1
		14/10/2020	1,0026	0,409	1,2753	82,1809	2
Média	Outubro	2020	1,00	0,41	1,28	82,18	
Desvio padrão							
		07/11/2020	0,025	0,2548	0,2798	8,935	3
		18/11/2020	0,0285	0,0314	0,0599	47,5793	4
		19/11/2020	26,4244	0,2963	26,7208	71,2695	5
Média	Novembro	2020	8,83	0,19	9,02	42,59	
Desvio padrão			15,24	0,14	15,33	31,46	
		03/12/2020	1,9564	0,0134	1,9698	99,3197	6
		10/12/2020	0,0934	0,2431	0,2149	52,8142	7
		13/12/2020	0,0078	0,0144	0,0222	35,1351	8
Média	Dezembro	2020	0,69	0,09	0,74	62,42	
Desvio padrão			1,10	0,13	1,07	33,15	
		01/01/2021					9
		07/01/2021	0,5907	0	0,5907	100	10
		21/01/2021	5,4456	0	5,4456	100	11
		26/01/2021	4,8587	0	4,8587	100	12
		28/01/2021	0,4043	5,031	5,4352	3,7742	13
Média	Janeiro	2021	2,82	1,26	4,08	75,94	
Desvio padrão			2,70	2,52	2,34	48,11	
		02/02/2021	265,042	552,2249	817,2669	16,3508	14
		04/02/2021	4,6939	0	4,6939	100	15
		05/02/2021	0,1008	0	0,1008	100	16
		09/02/2021	3,6847	0	3,6847	100	17
		15/02/2021	0	0	0	0	18

		17/02/2021	95,6336	20,1756	115,8092	82,5786	19
		18/02/2021	0,0317	0,0285	0,0602	52,6578	20
		25/02/2021	0,2853	0	0,2853	100	21
		26/02/2021	1,2165	0	1,2165	100	22
		28/02/2021	0	0	0	0	23
Média	Fevereiro	2021	37,07	57,24	94,31	65,16	
Desvio padrão			85,43	174,03	256,56	43,97	
		02/03/2021	0,1443	0	0,1443	100	24
		11/03/2021	0,0301	0,0352	0,0653	46,0949	25
		12/03/2021	0	0	0	0	26
		19/03/2021	2,3445	0	2,3445	100	27
		20/03/2021	0,0077	0,0009	0,0082	97,2868	28
		24/03/2021	0	0	0	0	29
Média	Março		0,42	0,01	0,43	57,23	
Desvio padrão			0,94	0,01	0,94	48,86	
		04/04/2021	0,0331	0,0285	0,0616	53,7525	30
		07/04/2021	1,2522	3,462	4,7141	26,2212	31
		13/04/2021	0,0389	0,0226	0,0615	63,2114	32
		14/04/2021	0	38,717	38,717	0	33
		24/04/2021	0,9073	0	0,9073	100	34
		29/04/2021	2,6798	0,0834	2,7632	98,089	35
Média	Abril	2021	0,82	7,05	7,87	56,88	
Desvio padrão			1,05	15,57	15,22	39,45	
		01/05/2021	0,0152	0,0336	0,0488	31,1475	36
		05/05/2021	0,0786	7,1406	7,2192	50,5129	37
		14/05/2021	0,0563	0,0254	0,0816	68,9127	38
		19/05/2021	0	0	0	0	39
		26/05/2021	14,8783	0	14,8783	100	40
Média	Maio	2021	3,01	1,44	4,45	50,11	
Desvio padrão			6,64	3,19	6,61	37,79	
		09/06/2021	0,1497	3,4573	3,607	50,8398	41
		16/06/2021	5,3702	0	5,3702	100	42
		23/06/2021	196,627	0,6774	197,3044	99,6567	43
Média	Junho	2021	67,38	1,38	68,76	83,50	

Desvio padrão			111,96	1,83	111,33	28,28	
		07/07/2021	0,0894	3,2292	3,3186	7,9303	44
		22/07/2021	11,0758	0	11,0758	100	45
		27/07/2021	0,4725	0	0,4725	100	46
Média	Julho	2021	3,88	1,08	4,96	69,31	
Desvio padrão			6,24	1,86	5,49	53,16	
		24/09/2021	967,9464	0	967,9464	100	47
Média	Setembro	2021	967,95	0,00	967,95	100,00	
Desvio padrão							
		07/10/2021	1,4488	0,0309	1,4797	82,3066	48
		21/10/2021	2,4951	0	2,4951	100	49
Média	Outubro	2021	1,97	0,02	1,99	91,15	
Desvio padrão			0,74	0,02	0,72	12,51	
		05/11/2021	0,3443	0,0645	0,4088	84,2202	50
		11/11/2021	0	0	0	0	51
		19/11/2021	5,0026	0,0026	5,0052	99,9481	52
		27/11/2021	4,4966	0	4,4966	100	53
Média	Novembro	2021	2,46	0,02	2,48	71,04	
Desvio padrão			2,65	0,03	2,64	47,94	
		10/12/2021	2,9836	0	2,9836	100	54
		23/12/2021	3,5977	10,6958	14,2934	31,0723	55
		31/12/2021	14,8973	0	14,8973	100	56
Média	Dezembro	2021	7,16	3,57	10,72	77,02	
Desvio padrão			6,71	6,18	6,71	39,80	
		01/01/2022					57
		08/01/2022	0,0272	0,0276	0,0548	49,635	58
		15/01/2022	0,011	0,0198	0,0308	35,7143	59
		22/01/2022	0,0099	0,0139	0,0238	41,5966	60
		29/01/2022	0,0184	0,0366	0,055	33,4545	61
Média	Janeiro	2022	0,02	0,02	0,04	40,10	
Desvio padrão			0,01	0,01	0,02	7,22	
Média geral			28,47	11,15	39,61	63,87	
Desvio padrão			133,08	72,53	165,94	38,02	
Valor máximo			967,9464	552,2249	967,9464	100,00	

Valor mínimo	0	0	0	0
--------------	---	---	---	---