



VIVIANE BARTELEGA

**SENSIBILIDADE DO FUNGO *Hemileia vastatrix* A
ESTROBILURINAS E METODOLOGIA PARA AVALIAR
GERMINAÇÃO DE ESPOROS EM MICROPLACA DE
“ELISA”**

LAVRAS-MG

2022

VIVIANE BARTELEGA

**SENSIBILIDADE DE *Hemileia vastatrix* A ESTROBILURINAS E METODOLOGIA
PARA AVALIAR GERMINAÇÃO DE ESPOROS EM MICROPLACA DE “ELISA”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza
Orientador

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza
Coorientador

LAVRAS-MG

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Bartelega, Viviane.

Sensibilidade de *Hemileia vastatrix* a estrobilurinas e metodologia para avaliar germinação de esporos em microplacas de “Elisa” / Viviane Bartelega. - 2022.

82 p.

Orientador(a): Paulo Estevão Souza.

Coorientador(a): Edson Ampélio Pozza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Sensibilidade à estrobilurinas. 2. Ferrugem do cafeeiro. 3. Nova metodologia. I. Souza, Paulo. II. Pozza, Edson. III. Título.

VIVIANE BARTELEGA

**SENSIBILIDADE DE *Hemileia vastatrix* A ESTROBILURINAS E METODOLOGIA
PARA AVALIAR GERMINAÇÃO DE ESPOROS EM MICROPLACA DE “ELISA”**

**SENSITIVITY OF *Hemileia vastatrix* TO STROBILURINS AND METHODOLOGY
TO EVALUATE SPORE GERMINATION IN “ELISA” MICROPLATE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de janeiro de 2022.

Dr. Rodrigo Luz da Cunha, EPAMIG.
Dr. Helon Santos Neto, UFLA.
Dr. Edson Ampélio Pozza, UFLA.

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza
Orientador

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza
Coorientador

LAVRAS-MG

2022

*Aos meus pais, Maria Eliana Silva Bartelega e Marcio Antônio Bartelega;
aos meus irmãos, Lucas Bartelega e Analice Bartelega;
à minha avó, Alice Meneguci da Silva.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e dar forças durante essa jornada.

À minha mãe Maria Eliana, ao meu pai Marcio, aos meus irmãos Lucas e Analice e aos meus cunhados Jéssica e Renan por todo carinho, incentivo e compreensão que foram essenciais para eu conseguir chegar até aqui. À minha família, minhas avós, tios e primos, especialmente à Ludmila, por sempre torcerem por mim.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, por ter me dado a oportunidade concedida para realizar o curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por conceder recursos financeiros para executar os projetos de pesquisa.

A UPL por contribuir na coleta de materiais e apoiar a realização da pesquisa.

Aos professores Dr. Paulo Estevão de Souza e Dr. Edson Ampélio Pozza, por toda orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao técnico do laboratório de Epidemiologia Silvio Calazans, por contribuírem etapas importantes do trabalho.

À Pós-doutoranda Dr^a Deila Botelho, por todo ensinamento e colaboração.

À secretária do DFP Ariane Alvarenga por todo apoio e acolhida durante o curso.

A todos os amigos do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas, em especial ao Júlio, por sua amizade e companheirismo.

Aos colegas dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal e Nematologia por me auxiliarem na execução do trabalho.

Aos meus queridos amigos Ariane, Yohana e Luiz Fernando, por todos os momentos compartilhados, apoio e motivação.

Aos parceiros que se dispuseram em ajudar na coleta de materiais para realizar essa pesquisa.

Aos demais amigos e pesquisadores do DFP, colegas de departamento que me auxiliaram e compartilharam seus conhecimentos, sendo fundamentais para realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix*, um fungo biotrófico, é considerada a doença mais devastadora do cafeeiro. Dentre as medidas de controle da doença, encontra-se a utilização de fungicidas. Entre eles, os do grupo químico das estrobilurinas. Embora ainda haja pouca informação sobre a mudança da sensibilidade de *H. vastatrix* a esses produtos, há registros para outros patossistemas. Porém, os estudos ‘*in vitro*’ para seleção de dose resposta ideal e análise de sensibilidade a fungicidas ainda são trabalhosos e consomem muito material. Portanto, esse trabalho foi realizado com os objetivos de desenvolver a metodologia para realizar testes de germinação de esporos de *Hemileia vastatrix* em microplacas ‘Elisa’ e identificar a sensibilidade de *Hemileia vastatrix* a estrobilurinas *in vitro*. Além disso, no campo, foram avaliados os principais fungicidas desse grupo químico em comparação com multissítios e mistura com triazóis. A metodologia para avaliar a germinação em placas ‘Elisa’ foi viável. Sendo as melhores concentrações da suspensão de esporos/ml e suas quantidades a serem depositadas nos poços da placa de 10^3 a 10^4 e de 150 a 250 microlitros, respectivamente, obtendo 45% de germinação. As temperaturas ideais foram 23°C combinada com 18 ou 24 horas de incubação e 25°C combinada com 10, 18 ou 24 horas de incubação, com germinação superior a 50%. Nos testes *in vitro* para sensibilidade à estrobilurinas, as populações de *Hemileia vastatrix* testadas foram sensíveis à azoxistrobina, piraclastrobina e picoxistrobina, porém, houve diferença nos níveis de sensibilidade entre os isolados. A dose de 128 ppm ou mg/Kg de ingrediente ativo, pode ser usada como dose resposta para testes de sensibilidade de *Hemileia vastatrix* à estrobilurinas *in vitro*. Já no ambiente controlado, em casa de vegetação e no campo, não foram observadas diferenças na sensibilidade, empregando a dose de bula das estrobilurinas ($p < 0,05$). No segundo ano avaliado, no campo, a picoxistrobina, a piraclastrobina e a mistura dessa última com epoxiconazole obtiveram maiores produtividades, em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$).

Palavras-Chave: Cafeeiro. Sensibilidade a estrobilurinas. *Hemileia vastatrix*. Controle Químico.

ABSTRACT

Rust, caused by *Hemileia vastatrix*, a biotrophic fungus, is considered the most devastating disease of coffee. Among the disease control measures, there is the use of fungicides. Among them, those of the chemical group of strobilurins. Although there is still little information about the change in *H. vastatrix* sensitivity to these products, there are records for other pathosystems. However, *in vitro* studies for optimal dose response selection and fungicide sensitivity analysis are still laborious and material consuming. Therefore, this work was carried out with the objectives of developing the methodology to carry out germination tests of *Hemileia vastatrix* spores in 'Elisa' microplates and to identify the sensitivity of *Hemileia vastatrix* to strobilurins *in vitro*. In addition, in the field, the main fungicides of this chemical group were evaluated in comparison with multisite and mixture with triazoles. The methodology was feasibility, with the best concentrations of spore suspension being 10^3 or 10^4 and the best amounts to be deposited on the plate are from 150 to 250 microliters, with 45% germination. The highest germination temperatures were 23°C combined with 18 or 24 hours of incubation and 25°C combined with 10, 18 or 24 hours of incubation, with germination higher than 50%. In *in vitro* tests for sensitivity to strobilurins, the populations of *Hemileia vastatrix* tested were sensitive to azoxystrobin, pyraclostrobin and picoxystrobin. However, there was a difference in the levels of sensitivity between the isolates. A dose of 128 ppm or mg/kg of active ingredient can be used as a dose response for testing the sensitivity of *Hemileia vastatrix* to strobilurins. In the controlled environment, under greenhouse conditions and in the field, differences in sensitivity were not observed, using the field dose of strobilurins ($p < 0.05$). In the second year evaluated, in the field, picoxystrobin, pyraclostrobin and the mixture of the latter with epoxiconazole obtained increase in the productivity in relation to the other treatments ($p < 0.05$).

Keywords: Coffee Tree. Strobilurin Sensitivity. *Hemileia vastatrix*. Chemical Control.

Sumário

PRIMEIRA PARTE.....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 A ferrugem do cafeeiro.....	12
2.2 Controle químico de doenças de plantas.....	13
2.2.1 Fungicidas inibidores da Quinona (QoIs)	14
2.3 Resistência de fungos a fungicidas	17
2.4 Teste de germinação de <i>Hemileia vastatrix</i> em laboratório	20
2.4.1 Germinação de patógenos bitróficos.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
SEGUNDA PARTE	
ARTIGO 1 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA AVALIAR A GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>Hemileia vastatrix</i> EM PLACA DE “ELISA”	31
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3 RESULTADOS.....	36
4 CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS.....	41
ARTIGO 2 - SENSIBILIDADE DO FUNGO <i>Hemileia vastatrix</i> A ESTROBILURINAS	43
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3 RESULTADOS.....	54
4 DISCUSSÃO	71
5 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO A.....	80
ANEXO A.....	81

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) tem centro de origem na Etiópia. De seus grãos, é obtida a bebida não alcoólica, mais apreciada no mundo. O Brasil é o maior produtor de café e mais de 87% da produção nacional está concentrada na região Sudeste (IBGE, 2021). A área total cultivada chega a 2,16 milhões de hectares, sendo o café uma das mais importantes ‘commodities’ produzidas no país (CONAB, 2021), contribuindo assim, com o crescimento da economia nacional e assegurando a sustentabilidade social nas comunidades rurais.

Entre os estados brasileiros produtores de café, Minas Gerais ocupa o primeiro lugar, sendo responsável por cerca de 50% da produção do país. A sua média de produção ultrapassa os 20 milhões de sacas beneficiadas de 60 kg/ano (CONAB, 2021). Apesar dessa alta produção, a demanda por maiores produtividades ainda é crescente, porém, vários fatores bióticos e abióticos podem reduzir tanto a produtividade quanto a qualidade da bebida (DE LIMA et al. 2012; COLARES, 2018; POZZA et al. 2021).

Dentre os fatores determinantes do crescimento e do desenvolvimento do cafeeiro pode-se destacar as doenças. Essas são responsáveis por reduzir consideravelmente a produtividade. Sendo a ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada por um fungo biotrófico, a *Hemileia vastatrix*, Berkeley e Broome, um dos problemas fitossanitários mais sérios da cultura. A primeira epidemia severa de ferrugem ocorreu no Sri Lanka em 1869 (BERKELEY; BROOME, 1869) e desde então encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras de café do Brasil (BARBOSA Jr. et al.2017; RESENDE et al. 2021). As perdas de produção na lavoura atribuídas a essa doença devem-se, basicamente, à desfolha prematura e a redução da área fotossintética da planta, com conseqüente morte dos ramos plagiotrópicos, isso torna seu cultivo antieconômico, comprometendo a safra futura (POZZA; POZZA, 2012). Os sinais da doença aparecem na parte abaxial das folhas de café e é caracterizado por aspecto pulverulento de coloração alaranjada (POZZA, 2021).

Mais de oitenta por cento da área plantada no Brasil é com cultivares suscetíveis a ferrugem, principalmente dos grupos Catuaí e Mundo Novo. Ainda plantados por serem robustos e resistentes a intempéries climáticas, como o déficit hídrico e ainda por

responderem a novas técnicas de cultivo com aumento de produção. Porém, com o aumento de produtividade, meta dos produtores de café do Brasil, ocorre aumento linear na intensidade da ferrugem e conseqüentemente maior número de pulverizações com fungicidas, devido a cultivar ser suscetível (POZZA et al. 2010; CUSTÓDIO et al. 2014).

Entre as técnicas de manejo de doenças de plantas, encontra-se o controle químico, com o emprego de fungicidas. Devido a facilidade de aplicação e por apresentar resultados mais rápidos. Sendo assim, estes tornaram-se amplamente difundidos em diversas culturas (MUELLER et al. 2017). Para o manejo da ferrugem recomenda-se a utilização de fungicidas de forma preventiva ou a partir da visualização dos sinais do patógeno com incidência inferior a cinco por cento no terço médio e inferior do cafeeiro. Entre os grupos químicos recomendados para controlar a ferrugem estão as Estrobilurinas e os Triazóis, além de fungicidas multissítios (FRAC-BR, 2021).

Os principais fungicidas utilizados no controle químico da ferrugem do cafeeiro são os sistêmicos e os mesostêmicos, Triazóis e Estrobilurinas. Além dos protetores ou de contato do grupo dos Cúpricos e dos Ditiocarbamatos, com pulverizações entre os meses de agosto a março, antecedendo os níveis de controle (POZZA 2021). A mistura de fungicidas do grupo dos Triazóis com as Estrobilurinas são as mais utilizadas no controle da doença. Os Triazóis atuam inibindo a síntese do Ergosterol em fungos superiores e as Estrobilurinas interrompem a respiração mitocondrial (BARBOSA JUNIOR, 2020). No entanto, o uso contínuo dessas moléculas pode proporcionar perda de sua efetividade, selecionando isolados ou até mesmo raças resistentes a esses princípios ativos, com perda de sensibilidade. Resistência já relatada para a ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) (ALVIM et al., 2009) e a *Cercospora coffeicola* (SANTOS, 2015).

A seleção de patógenos resistentes a fungicidas é um dos mais importantes problemas do controle químico de doenças de plantas (GHINI; KIMATI, 2000, SALCEDO-SARMIENTO et al. 2021). Por ser perene, o cafeeiro é cultivado como monocultura em vastas extensões geográficas, com isso, vários ciclos de vida do patógeno podem ocorrer ao longo do ano (VÁRZEA; MARQUES,2005). Considerando alguns aspectos desse patossistema, como a variabilidade genética do patógeno e a produção de grande quantidade de esporos, facilmente dispersos por vento, as chances de ocorrer a seleção de isolados resistentes ou com perda de sensibilidade a fungicidas aumentam (BRAGANÇA, 2010). Para a análise da sensibilidade à fungicidas, a contagem de esporos em laboratório normalmente é feita em placas de Petri, com o intuito de determinar a

concentração de esporos em amostras, para os mais variados estudos (BETTIOL; VARZEA, 1992; OLIVEIRA, 2005b). No entanto, são necessárias metodologias rápidas e precisas para determinar a quantidade de esporos de *H. vastatrix* in vitro. Uma proposta de estudo, é a contagem de esporos em placas Elisa, no qual é possível realizar esse procedimento com grandes quantidades de amostras em menor tempo e espaço, quando comparadas a metodologia utilizando placas de Petri.

Relatos da perda de sensibilidade de *H. vastatrix* a estrobilurinas é escassa na literatura, porém há registros da sua ocorrência para outros fungos causadores de ferrugens (SALCEDO-SARMIENTO et al., 2021). Com isso, fica a dúvida se o mesmo está acontecendo com esse patógeno. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a sensibilidade de diferentes isolados de *H. vastatrix* a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas e validar a metodologia para realizar testes de germinação com esporos de *H. vastatrix* em microplacas ‘Elisa’, de 96 poços.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A ferrugem do cafeeiro

A ocorrência de doenças é um dos principais fatores responsáveis por perdas na cafeicultura, estes fatores vão desde a fase de viveiro até a produção final. Aproximadamente, 80% da área plantada no Brasil é com cultivares suscetíveis às principais doenças da cultura. Dentre as doenças do cafeeiro destaca-se a ferrugem alaranjada. Busca por maiores produtividades, em espaçamentos adensados e novas técnicas de cultivo intensivo, tem aumentado a intensidade dessa doença e gerado perdas significativas (POZZA et al, 2010; COLARES, 2018). Seu agente etiológico é *Hemileia vastatrix*, um fungo biotrófico. Descrita primeiramente por J. M. Berkeley em 1869 no Sri Lanka (BERKELEY; BROOME, 1869). No Brasil foi descrita na década de 1970 em Itabuna, região sul do estado Baiano (WELLMAN, 1970). Atualmente, encontra-se disseminada em todas regiões produtoras do país e é considerada a doença de maior ocorrência em cafeeiros (POZZA et al, 2010).

O patossistema *Hemileia vastatrix* é geneticamente variável tendo, até o momento, mais de 50 raças já caracterizadas no mundo (GICHURU et al., 2012; TALHINHAS et al., 2017). No Brasil, 15 raças fisiológicas do fungo (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII, XXXVII) foram identificadas,

sendo a raça II a de maior frequência (SILVA, 2017). A ocorrência de raças com amplo espectro de virulência, como a raça XXXVII (v2,5,6,7,9) (CABRAL et al., 2009), e a alta diversidade genética das populações do patógeno (NUNES et al., 2009) representam um grande desafio para a cafeicultura.

Os sintomas iniciais da doença podem aparecer em folhas jovens e velhas. Caracterizados em manchas cloróticas na face abaxial da folha, aumentando de tamanho e número com o progresso da infecção. Nesse mesmo local, o sinal ou esporulação do patógeno tem aspecto pulverulento de coloração alaranjado. O período de infecção se inicia nos meses de novembro a dezembro e vai até maio, podendo variar de acordo com as condições climáticas (ALFONSI et al, 2019). A doença tem aparecido em quantidade significativa após o período normal de infecção mesmo tendo sido realizadas as aplicações químicas de controle, denominada ferrugem tardia. Uma das prováveis explicações para esse fato é a redução da sensibilidade aos fungicidas, associada a novas técnicas de produção intensiva nas mesmas cultivares já implantadas e o cenário de alterações climáticas (POZZA; ALVES, 2008).

O manejo dessa doença geralmente é realizado por dois métodos, o genético e o químico. O controle químico é realizado, na maioria das vezes, com fungicidas sistêmicos do grupo dos triazóis, ou mesostêmicos, das estrobilurinas. Entretanto, o uso contínuo desses produtos pode causar seleção de populações de patógenos resistentes e reduzir a sustentabilidade do agro ecossistema, com consequente impacto negativo na exportação do café e no custo de produção (FRAC, 2021).

2.2 Controle químico de doenças de plantas

O controle químico de doenças de plantas é uma das medidas mais eficientes e economicamente viáveis de garantir alta produtividade e qualidade da produção, com os cultivares e técnicas de cultivo atuais, utilizadas para atender a demanda atual da população global (SOUSA et al., 2019).

Variedades de plantas cultivadas, interessantes por ter bom desempenho agrônomico e preferência dos consumidores, geralmente aliam a certa vulnerabilidade a agentes fitopatogênicos, isso torna obrigatória a convivência com patógenos dentro da agricultura (KIMATI,2011).

Para controlar as doenças do cafeeiro recomenda-se pulverizações foliares, na pré e pós-florada, geralmente entre os meses de setembro a novembro e posteriormente para

manejo da ferrugem e da cercosporiose entre os meses de dezembro a março (PERARO, et al. 2016). Os fungicidas utilizados, normalmente, são misturas entre fungicidas sistêmicos, do grupo dos triazóis e mesostêmicos das estrobilurinas, alternados ou misturados com fungicidas protetores, de contato ou multissítios, os ditiocarbamatos e os cúpricos (POZZA et al, 2010).

Os fungicidas são categorizados de várias maneiras baseado em diferentes características, como o espectro de ação e a mobilidade na planta. Com relação ao espectro de ação, os fungicidas são de sítio-específico ou multissítios, estes são ativos contra um único ou mais pontos da via metabólica necessária para o crescimento e/ou desenvolvimento do patógeno (MCGRATH, 2012). Portanto, o mecanismo de ação é a forma dos fungicidas atingirem os fungos e, dependendo do ativo, causam danos nas suas membranas celulares, inativam enzimas e proteínas essenciais ou interferem em processos chave como produção de energia e respiração. A mobilidade na planta dos fungicidas pode ser de duas formas, sendo elas de contato, permanecendo na superfície das plantas, ou sistêmicos, são absorvidos para dentro das plantas e transloucados, geralmente via xilema (SOUZA; DUTRA, 2003).

Fungicidas sistêmicos são produtos capazes de penetrar na planta e serem tóxicos nos processos vitais dos fungos. O conjunto químico sistêmico deve ser prontamente assimilado, transloucado e inibir infecções locais e distantes do local de aplicação, sem afetar ou causar toxidez aos tecidos do hospedeiro (SOUZA; DUTRA, 2003). Os mesostêmicos apresentam ação loco-sistêmica, ou seja, são transloucados somente por pequenas distâncias dentro da planta (REIS et al., 2001).

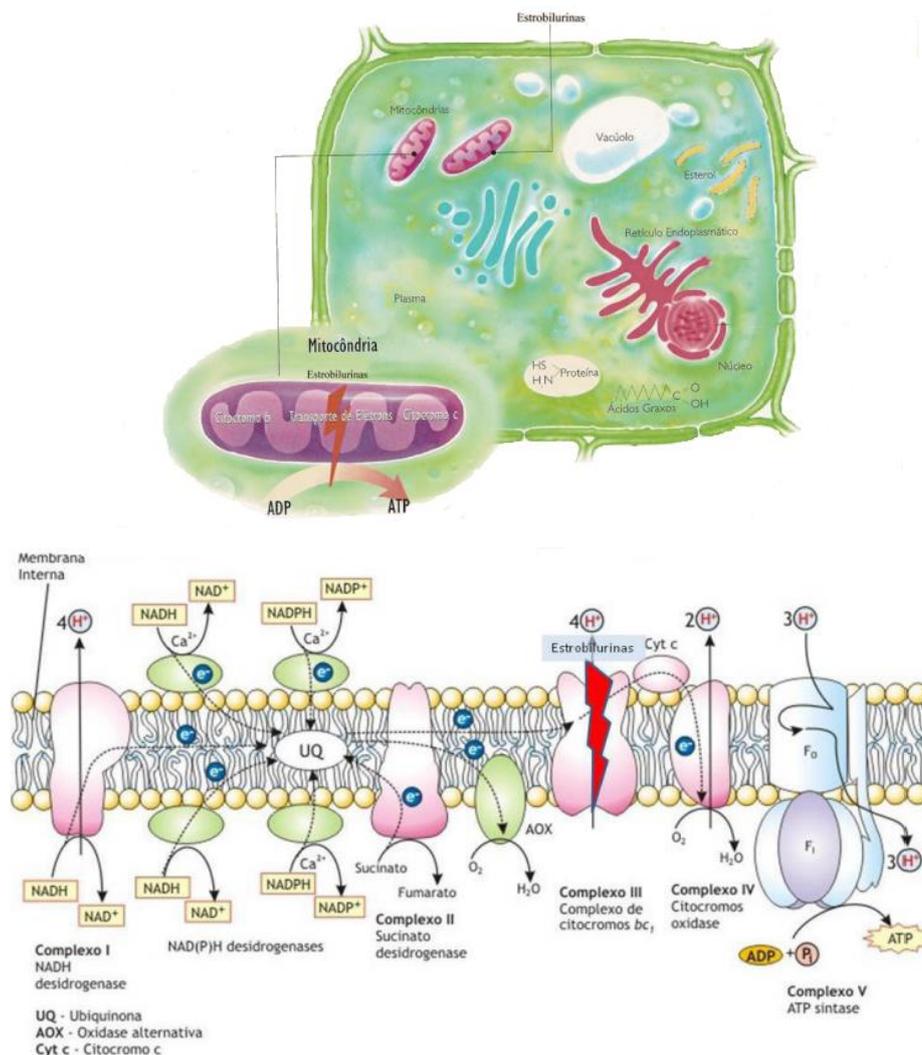
Dentre os fungicidas sistêmicos pode-se citar os triazóis e os mesostêmicos as estrobilurinas. Os triazóis pertencem ao grupo dos inibidores de biossíntese de esteróis. Já as estrobilurinas são moléculas inibidoras da quinona (BALARDIN, 2019).

2.2.1 Fungicidas inibidores da Quinona (QoIs)

O grupo químico das Estrobilurinas são compostos extraídos, a princípio, do fungo *Strobilurus tenacellus*, sendo um dos grupos mais comercializado na agricultura (BARLETT et al, 2002; PARREIRA et al., 2009; GODOY et al., 2009). As Estrobilurinas são moléculas de sítio específico e atuam como inibidoras da quinona oxidase (QoI) (Figura 1). O sítio de ligação é a oxiredutase ubihidroquinona-citocromo-c, indisponibilizando oxigênio para a célula. Atuam na cadeia respiratória, no Complexo III,

inibindo a respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o c1, no sítio Qo dentro do ciclo da Coenzima Quinol (CoQ), interferindo na formação de ATP, energia vital para o crescimento dos fungos (FRAC, 2012).

Figura 1 - Mecanismo de ação das estrobilurinas no Complexo III da cadeia transportadora de elétrons.



Fonte: Zambolim et al. 2007.

Fungicidas do grupo das estrobilurinas atuam, principalmente, de forma preventiva, inibindo a germinação de esporos, o crescimento do tubo germinativo e do micélio de penetração, podendo também ter ação no micélio de colonização impedindo o crescimento de fungos em estádios iniciais (BARBOSA JUNIOR, 2020). A absorção das moléculas nas folhas ocorre de forma gradual e constante, conferindo proteção por mais

tempo, apresentando distribuição mesostêmica uniforme. Uma substância química é considerada mesostêmica quando apresenta estreita afinidade com a superfície foliar da planta, sendo absorvida na camada de cera, e após, redistribuída na superfície vegetal. Moléculas desse grupo apresentam difusão translaminar, com translocação vascular via floema ou xilema, sendo eficientes no controle de grande número de fitopatógenos em baixas concentrações, permitindo, dessa forma, maior intervalo entre as aplicações (VENANCIO et al., 2004).

Quando aplicadas nas plantas, as estrobilurinas atuam na ativação da enzima NADH-nitrato redutase, aumentando a assimilação de nitrato e sua incorporação nas moléculas da planta, como por exemplo, a clorofila (PARREIRA et al., 2009). Entre outros efeitos, a aplicação de Estrobilurinas aumenta a eficiência de assimilação de CO₂ na planta, eleva a taxa fotossintética, reduz a taxa respiratória e a produção de etileno, retardando a senescência das folhas, aumentando o período de fotossíntese na planta (VENÂNCIO et al., 2003; OLIVEIRA, 2005a; FAGAN, 2007).

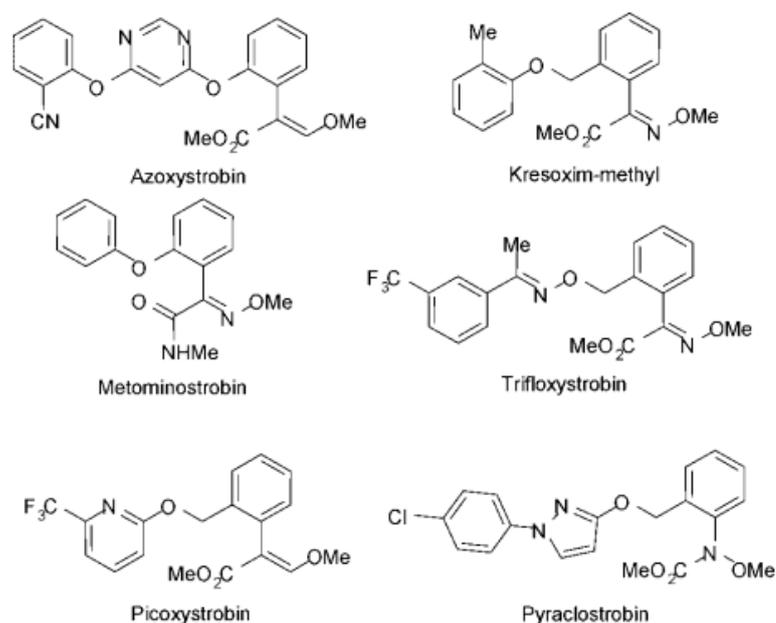
A introdução comercial de Qol's ocorreu em 1996 e após o início de sua comercialização, foram descritos relatos de resistência em vários patógenos e locais (DÉLYE et al., 1997; ISHII et al., 2001; KIM et al., 2003; STERGIOPOULOS et al., 2003; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2006). Na maioria dos casos de resistência descritos ocorreu mudança pontual no citocromo b, trocando o aminoácido guanina na posição 143 por alanina. Nesses casos, o uso isolado de Estrobilurina pode ter influenciado na resistência dos fungos ao fungicida. Tal resistência pode ser atribuída ao modo de ação específico das Estrobilurinas, por terem como único modo bioquímico de ação a inibição em único sítio da respiração mitocondrial (PARREIRA et al., 2009).

A utilização constante de QoI pode ter favorecido nos últimos anos para a seleção de populações de patógenos resistentes, como por exemplo na cultura do milho (MACIEL, 2011). Isso porque fungicidas pertencentes a um mesmo grupo químico podem apresentar resistência cruzada. A resistência cruzada ocorre quando populações de um patógeno desenvolvem resistência a um fungicida e ao mesmo tempo, apresenta resistência a outros fungicidas, sendo afetados com a mesma mutação gênica e mesmo mecanismo de resistência (FRAC, 2012).

Atualmente, o grupo das estrobilurinas é um dos mais comercializados no controle de patógenos de plantas. Das principais moléculas existentes no mercado pode-se citar a azoxistrobina, piraclostrobina, picoxistrobina, Cresoxim-metilico e trifloxistrobina,

podendo ser encontradas em fungicidas com ativo único ou em mistura com outros grupos químicos (BALARDIN, 2021).

Figura 2 - Fungicidas estrobilurinas.



Fonte: D. W.Barlett et al, 2002.

2.3 Resistência de fungos a fungicidas

Vários mecanismos como a alteração do sítio alvo, a síntese de enzima alternativa capaz de substituir a enzima alvo, a superprodução do alvo do fungicida e a ativação do efluxo celular reduzindo absorção do fungicida podem conferir resistência. Além disso, alguns mecanismos ainda não conhecidos também podem ser responsáveis por reduzir a sensibilidade a fungicidas (MCGRATH, 2001). Um dos mecanismos de resistência para fungicidas a QoI envolve mutação do gene dos citocromos b, gerando alterações na sequência de nucleotídeos por impedirem a ligação com o fungicida. Essa mutação resulta em resistência completa do patógeno ao fungicida (OLIVEIRA et al., 2015).

Os fungicidas ainda são essenciais para manter viável e elevada a qualidade dos produtos agrícolas. Até 1970, quase todos os fungicidas utilizados para controlar patógenos de plantas eram de ação multissítio, com efeito protetor. Apesar do uso generalizado, a resistência a esses compostos foi evento raro, devido a atuarem em vários alvos do patógeno. No entanto, com a introdução dos fungicidas com sítio-específico, no final dos anos 1970, muitos deles de origem na indústria farmacêutica, fungos

fitopatogênicos resistentes a fungicidas tornaram-se problema importante na proteção das culturas (BRENT; HOLLON, 2007).

A resistência a fungicidas é definida como alteração herdável e estável do fungo em resposta à aplicação de fungicidas, geralmente devido ao uso contínuo do mesmo, resultando na seleção de organismos resistentes e redução da sensibilidade ao produto. (EUROPEAN, 1988; SANTOS, 2015). Resistência é a redução significativa da sensibilidade de linhagens anteriormente sensíveis ao fungicida, por meio de mecanismos de variabilidade como a mutação (EUROPEAN, 1988; SANTOS, 2015).

A resistência pode ser resultante de mutações de múltiplos genes. Isolados resistentes surgem a partir da taxa natural de mutações genéticas. Quando o fungicida é capaz de controlar de forma eficaz os isolados sensíveis, os resistentes podem tornar-se dominantes nas populações dos patógenos. Desse modo, sob a pressão de seleção do uso contínuo de fungicidas do mesmo grupo químico ao longo do tempo, falhas no controle da doença podem ocorrer (SCHNABEL; JONES, 2001).

Pode-se associar o risco de resistência de fungicidas com a sua sistemicidade. Já, os fungicidas multissítios, porém protetores ou de contato, apresentam amplo espectro de ação. Por interferirem em diversos processos metabólicos vitais do fungo, esses produtos apresentam baixo risco de resistência ao patógeno. Os fungicidas de ação sistêmica apresentam maior especificidade. Esta especificidade facilita a ocorrência de mutações pontuais e, conseqüentemente, favorece o aparecimento ou seleção de isolados mutantes do patógeno resistentes a esses fungicidas (RODRIGUES et al., 2007).

A resistência à fungicidas Inibidores da quinona oxidase (QoI) pode ser conferida com a mutação no gene do citocromo b (CYTB) por meio da substituição do aminoácido glicina por alanina no códon 143 (G143A) (CASTROAGUDIN et al., 2015). Outra mutação pode ocorrer no gene *cytb*, de fenilalanina para leucina na posição 129 (F129L) ligada a resistência de fungos a QoI (GISI et al., 2002; GRASSO et al., 2006), incluindo *Phakopsora pachyrhizi* na soja (KLOSOWSKI et al., 2016; MAY DE MIO et al., 2018). Além disso, a resistência de fungos a QoI pode estar associada a redução da absorção ou aumento do efluxo do fungicida, a falta de conversão para o composto ativo e detoxificação da molécula fungicida (HAWKINS; FRAAIJE, 2018).

Alterações na sensibilidade de um patógeno é um evento significativo com implicações práticas e tem de ser monitorada. Um dos métodos mais utilizados para determinar a sensibilidade de um microrganismo é a determinação da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) (EDGINGTON; KHEW; BARRON, 1971). De acordo com os

critérios propostos por Edgington, Khew e Barron (1971), compostos químicos com CI_{50} menor que 1 ppm são considerados altamente fungitóxicos, com CI_{50} entre 1 e 50 ppm, moderadamente fungitóxicos e com CI_{50} maior que 50 ppm, não tóxicos.

Considerando a sensibilidade, alguns aspectos do patossistema *Hemileia vastatrix* podem contribuir para aumentar as chances de a resistência ocorrer. O patógeno é geneticamente variável e produz grande quantidade de esporos, facilmente dispersos com o vento. Como o cafeeiro é perene e é cultivado como monocultura em vastas extensões geográficas, vários ciclos de vida do patógeno podem ocorrer ao longo do ano (BRAGANÇA, 2010).

Isolados de patógenos importantes foram identificados com resistência a QoIs logo após a introdução dos mesmos no mercado em 1996 (BARTLETT et al., 2002). Um dos primeiros casos de resistência a Estrobilurinas foi relatado em isolados de *Padospora fusca*, agente causal do míldio das cucurbitáceas (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2006). Grande parte dos estudos de resistência relatados, foi observada uma mudança pontual no citocromo b, com troca do aminoácido guanina na posição 143 por alanina (PARREIRA et al., 2009). No caso de *P. fusca*, a resistência à Estrobilurinas pode estar relacionada ao uso isolado de QoI no controle de míldios pulverulentos (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2006).

Um dos mais importantes casos relatados de resistência a Estrobilurinas no Brasil foi o de *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem da soja (SCHMITZ et al., 2014). Indivíduos com mutações no genoma na posição F129L foram observados na safra 2013/2014 (BARBOSA JUNIOR, 2020). Outras mutações como G143A e G137R foram relatadas como passíveis de ocorrer, quando selecionados indivíduos cada vez mais resistentes a esses fungicidas (GRASSO et al., 2006; VALLIERI et al., 2011).

Avila-Adame e Koller (2003) também verificaram duas mutações em isolados de *Magnaporthe grisea*, criado em laboratório resistentes a QoI. A primeira mutação ocorreu em G143A e a segunda no códon G143S (glicina para serina). No estudo, os autores observaram mutações estáveis durante quatro ciclos consecutivos da doença na ausência de Azoxistrobina. Santos et al., (2015) constataram redução na sensibilidade de isolados *Cercospora coffeicola* a estrobilurinas em diferentes doses.

Contudo, a resistência é um dos principais entraves do controle químico e este é o principal método de controle utilizado. Com isso, é importante a realização de estudos a fim de prevenção e manejo da resistência de fitopatógenos. Monitorar a sensibilidade de

populações garante a eficiência e a permanência das moléculas disponíveis no mercado por mais tempo.

2.4 Teste de germinação em laboratório

De acordo com Anesiadis et al. (2003), as estrobilurinas agem na superfície da folha, inibindo os primeiros estádios do processo de infecção, como a germinação de esporos, penetração e estabelecimento inicial do patógeno. Portanto, devido ao mecanismo de ação e características deste grupo químico, a metodologia mais adequada para avaliar a sensibilidade de fungos a estrobilurina é o teste de germinação de esporos, comumente realizado em meio de cultura incorporado ao fungicida (GULART, 2009; FRAC, 2018). Diversos trabalhos já foram realizados utilizando testes de germinação com intuito de verificar a sensibilidade de fungos à estrobilurinas a partir da dose letal para inibir 50% da germinação (Ec50).

Bragança (2010) coletou isolados de *Hemileia vastatrix* nas principais regiões produtoras de Minas Gerais e Espírito Santo, a fim de determinar se há sensibilidade dos isolados aos fungicidas a base de azoxistrobina e tebuconazol, por meio da estimativa da dose efetiva para inibir 50% da germinação do patógeno (Ec50). Para isso, esse autor avaliou *in vitro* a germinação dos isolados submetidos as concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 µg/ml de tebuconazol e 0; 0,068; 0,136; 0,204; 0,272 e 0,34 µg/ml de azoxistrobina. Os resultados mostraram que a Ec50 dos ativos ficou abaixo de 1 ppm não havendo isolados de *Hemileia vastatrix* resistentes aos ativos testados.

Para outro fungo do cafeeiro, Santos et al. (2015) constataram redução na sensibilidade a estrobilurina em isolados de *Cercospora coffeicola*, agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro, proveniente do estado da Bahia, por meio da concentração inibitória a 50% (IC50), a concentração inibitória mínima (CIM) e o percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) determinados com crescimento micelial do isolado *de C. coffeicola* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de azoxistrobina (250;25; 2,5; 0,25; 0,025 e 0 ppm).

Já, Koga et al (2018) verificaram que não há correlação entre a frequência de valores de Ec50 com a mutação F129L que confere sensibilidade aos fungicidas QoI em amostras de *Phakopsora pachyrhizidis* principais regiões produtoras de soja no Brasil. Estes autores submeteram populações de *Phakopsora pachyrhizi* amostradas em ensaios de campo ao fungicida à base de azoxistrobina nas doses de 0, 0,003125, 0,03125, 0,125,

0,25, 1, e 10ppm, usando a metodologia de germinação de esporos em placas de petri, conforme recomendação do Frac.

Blum e Reis (2013) detectaram comportamento diferente nos valores no IC50 para os grupos químicos DMIs e QoI quando testaram, *in vitro*, um inóculo considerado sensível de *Phakopsora pachyrhizi* coletado de planta de soja naturalmente infectadas no ciclo de crescimento de 2004/05 em Passo Fundo (Rio Grande do Sul, Brasil). Neste trabalho o IC50 para *P. pachyrhizi* foi determinado usando formulações comerciais nas seguintes concentrações (ingrediente ativo): azoxistrobina (0, 0,005, 0,05, 0,5 e 5 ppm), picoxistrobina e piraclostrobin (0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 e 5 ppm), trifloxistrobina (0, 0,001, 0,01, 0,1 e 1 ppm), ciproconazol (0, 0,5, 2,5, 5, 10 e 20 ppm), epoxiconazol (0, 0,005, 0,05, 0,5, 2,5 e 5 ppm), flutriafol (0, 0,05, 0,5, 5 e 25 ppm), metconazol (0, 0,005, 0,05, 0,5, 2,5 e 5 ppm), miclobutanil (0, 0,5, 1, 2, 4 e 8 ppm), tebuconazol (0, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05 e 0,5 ppm) e tetraconazol (0, 2, 4, 5, 10, 20 e 40 ppm). Os valores de IC50 foram gerados após seis horas de exposição dos uredosporos aos fungicidas. Para miclobutanil e tebuconazol, 100% de inibição da germinação de uredósporos foi encontrada em apenas seis horas de exposição. Para miclobutanil e flutriafol, foi detectada 99,1% de inibição da germinação; para tetraconazol, 99,0%; para ciproconazol, 98,1%; e para o epoxiconazol, 98,0% de inibição.

2.4.1 Germinação de patógenos biotróficos

Os patógenos denominados biotróficos sobrevivem somente em tecidos vivos dos hospedeiros, como os agentes causais das ferrugens e dos oídios não apresentando fase saprofítica. Os fungos biotróficos têm como principal mecanismo de sobrevivência o parasitismo de plantas hospedeiras (REIS; BIANCHIN, 2011). Dessa forma, patógenos biotróficos não crescem em meio de cultura, sendo sua principal fonte de inóculo, plantas infectadas com o próprio patógeno. Por esse motivo, os testes *in vitro* com esse tipo de patógeno, são limitados apenas a avaliação de germinação de seus esporos, normalmente realizados em placa de Petri.

Existem diversos métodos descritos na literatura utilizados para detectar e monitorar variação fenotípica na sensibilidade, principalmente de fungos hemibiotróficos e necrotróficos a fungicidas, com objetivo de comprovar a ocorrência de redução da sensibilidade em populações de fitopatógenos (CASADO et al. 2018). Esses métodos convencionais, são aplicados basicamente para avaliar crescimento micelial *in*

in vitro em meios de cultura com pequenas doses de fungicidas para determinar a EC₅₀ (COOLS et al., 2010; COOLS et al., 2012; LEROUX et al., 2007). Porém, em sua maioria, são demorados, com pouca acurácia e pouco eficientes no uso de recursos, por requererem grandes quantidades de placas de Petri e meios de cultura, além de causarem maiores danos ambientais devido a geração de maior quantidade de material de descarte com resíduos tóxicos (ARIKAN, 2007; BAMPI et al., 2013; REKANOVIC & POTOČNIK, 2010).

Uma alternativa viável para contagem de esporos de *H. vastatrix* é a utilização de placas Elisa com água destilada, metodologia ainda não descrita para esse patógeno, porém uma técnica utilizada com bons resultados no estudo de germinação de outros fitopatógenos (MARCONDES et al. 2014; BRAND, 2012; SOUZA, 2010).

Com o método de germinação em microplacas, Duhatschek, Santos e Faria (2018) identificaram redução da sensibilidade de isolados do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem da soja, provenientes de cinco localidades da região de Centro Oeste do Paraná ao produto trifloxistrobina + protioconazol (Fox[®]). Casado et al. (2018) comprovaram eficiência na detecção de resistência a fungicidas triazóis (IDM) e estrobilurinas (IQe) em populações do patógeno da brusone do trigo, também utilizando o método de leitura em microplaca ou placa Elisa. No estudo, para o método de placas de Petri foram necessárias um total de 52 horas de trabalho, 14 horas a mais quando comparado com o método de microplacas.

Sendo assim, é necessário comprovar a sua eficiência e a sua confiabilidade, como também tornar conhecidas as condições ideais para serem executados os ensaios com *Hemileia vastatrix*, tornando o processo mais simples e econômico, além de proporcionar avaliação mais rápida. Dessa forma, a técnica é ideal para experimentos com diversos tratamentos e repetições, com fungos biotróficos, tornando viável e rápida a execução dos mesmos em ambiente otimizado.

REFERÊNCIAS

AGRIOS GN. 2005. **Plant Pathology**: 5ª edição, Elsevier pp 562-580.

ALFONSI, W. M. V. Incubation period of coffee leaf rust. **Summa phytopathologica**. vol.45 no.2 Botucatu, 2019.

ALVIM, M. S.; JULIATTI, F. C.; ALVIM, J. R. M. G.; PARREIRA, F. O. S.; SILVA, O. S.; JULIATTI, B. C. M.; REZENDE, A. A.; MARTINS, J. A. S.; SAGATA, E.

- Avaliação de fungicidas registrados no MAPA no controle da ferrugem da soja. **Tropical Plant Pathology**, Brasília. v. 34, p. S84, 2009.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia** Vol. 1 5ª Ed. 573p. 2018.
- ANESIADIS, T.; KAROAGLANIDIS, G. S.; TZAVELLA-KLONARI, K. Protective, curative and eradicant activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. **Journal of Phytopathology** 151: 647-651. 2003.
- ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Medical Mycology**, Wilmington, v.45, p.495-587, 2007.
- AVILA-ADAME, C.; KÖLLER, W. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. **Current Genetics**, New York, v. 42, n. 6, p. 332-338, 2003.
- BALARDIN, R. **Fungicidas sistêmicos: benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas**. Disponível em: <<https://elevagro.com/materiais-didaticos/fungicidas-sistemicos-benzimidazois-triazois-e-estrobilurinas/>>. Data de acesso: 13 de novembro de 2021.
- BARBOSA JR, M. P. et al. Irrigação por gotejamento e manejo do fósforo no progresso da ferrugem do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 39-48, 2017.
- BARBOSA JUNIOR, M. P. **Management of coffee rust and brow eye spot using cultural and chemical control**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, 99p, 2020.
- BARTLETT, D. W. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.
- BERKELEY, M.J.; BROOME, C.E. *Hemileia vastatrix*. *Gardeners' Chronicle*, 6, 1157. 1869.
- BETTIOL, W.; VARZEA, V. M.P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, 1992.
- BLUM, M.M.C; REIS, E.M. *Phakopsora pachyrhizi* in vitro sensitivity to fungicides. **Summa Phytopathologica**. v. 39, p. 215-216, 2013.
- BRAGANÇA, C.A.D. Sensibilidade de isolados de *Hemileia vastatrix* a azoxistrobina e tebuconazol. Viçosa MG. 2010.
- BRENT, K; HOLLOMON, D.H. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management**. FRAC Monograph V. 2. CropLife International, Brussels, 56 pp. 2007.

- CABRAL, P.G.C.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; LELIS, T.P.; CAPUCHO, A.S.; CAIXETA, E.T. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes** 4:129-130. 2009.
- CASADO, P. S.; CARVALHO, G.; CERESINI, P. C.; CASTROAGUDIN, V. L.; SABBAG, O. J.; CAMPOS, S. M.; MACIEL, J. L. N. Método eficiente, baseado em leitores de microplaca, para detecção de resistência a fungicidas triazóis (IDM) e estrobirulinas (IQe) em populações do patógeno da brusone do trigo. **Summa Phytopathologica.**, Botucatu, v. 44, n. 3, p. 236-244, 2018.
- CASTROAGUDIN, V. L. et al. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 37, p. 199–216, 2016.
- COLARES, M. R. N. **Modelagem de perdas de produtividade do cafeeiro relacionada à ferrugem**. Universidade Federal de Lavras, 2018.
- COOLS, H.J.; BAYON, C.; ATKINS, S.; LUCAS, J.A.; FRAAIJE, B.A. Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. **Pest Management Science**, West Sussex, v.68, n.7, p.1034-1040, 2012.
- COOLS, H.J.; PARKER, J.E.; KELLY, D.E.; LUCAS, J.A.; FRAAIJE, B.A.; KELLY, S.L. Heterologous expression of mutated eburicol 14 α -demethylase (CYP51) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, n.9, p.2866-2872, 2010.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>> Acesso em jun de 2021.
- COSTA, R.V. da; COTA, L.V.; SILVA, D.D. da; MEIRELLES, W.F.; LANZA, F.E. Viabilidade técnica e econômica da aplicação de estrobilurinas em milho. **Tropical Plant Pathology**, v.37, p.246-254, 2012. DOI: 10.1590/S1982-56762012000400003.
- COUTINHO TA, RIJKENBERG FHJ, VAN ASCH MAJ. Teliospores of *Hemileia vastatrix*. **Mycological Research** 8: 932-934. 1995.
- CUSTÓDIO, A. A. P.; POZZA, E. A.; CUSTÓDIO, A. A. P.; SOUZA, P. E.; LIMA, L. A.; SILVA, A. M. Effect of Center-Pivot Irrigation in the Rust and Brown Eye Spot of Coffee. **Plant Disease**, 2014.
- DE LIMA, L. M.; POZZA, E.A.; SANTOS, F.S. Relationship between of Brown Eye Spot of Coffee Cherries and the Chemical Composition of Coffee Beans. **Journal of Phytopathology**, 2012.
- DELYE, C; LAIGRET, F; CORIO-COSTET, M. F. (1997). A mutation in the 14_ α demethylase gene of *Uncinula_ necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. **App Env Microbiol**, 63:2966-2970, 1997.

DOURADO NETO, D.; OLIVEIRA, R.F.; BEGLIOMINI, E.; RODRIGUES, M.A.T. F500 em soja e milho - Efeitos fisiológicos comprovados. **Atualidades Agrícolas BASF S.A.**, p.12-16, 2005.

DUHATSCHEK, E.; SANTOS, L. A.; FARIA, C. M. D. R. Sensibilidade de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* provenientes da região do centro oeste do Paraná a fungicidas. **Summa Phytopathol.** 44 (2). Abr-Jun 2018.

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

FAGAN, E.B. **A cultura da soja: modelo de crescimento e aplicação da estrobilurina Piraclostrobina.** 2007. 84p. Tese (Doutorado) – ESALQ, Piracicaba.

FERNANDES, R.C.; EVANS, H.C.; BARRETO, R.W. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. **Tropical Plant Pathology** 34 (2): 108-113. 2009.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; LÓPEZ-RUIZ, F.; ROMERO, D.; VICENTE, A.; TORÉS, J.A. Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podospheera fusca* in south central Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v.115, p.215– 222, 2006.

FRAC-BR (Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas). Recomendações para a cultura do Café. Disponível em: < <https://www.frac-br.org/cafe>>. Acesso em mai de 2021.

FRAC - Fungicide resistance action committee. In: List of pathogens with field resistance towards IQo fungicides (updated 12/09/12). Disponível em: <<https://www.frac.info/>>. Acesso em jun 2021.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. **Embrapa Meio Ambiente.** Jaguariuna-SP. 2. ed. 78 p. 2000.

GICHURU, E.K., ITHIRU, J.M., SILVA, M.C., PEREIRA, A.P., VÁRZEA, V.M.P. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology** 37:424-427. 2012.

GISI, U. et al. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 859-67, Sep 2002.

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**, v.34, p. 56-61, 2009.

GRASSO, V.; SIEROTZKI, H.; GARIBALDI A.; GISI, U. Characterization of the cytochrome b gene fragment of *Puccinia* species responsible for the binding site of Qol fungicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.84, n.2, p.72-82, 2006.

GULART, C. A. **Sensibilidade in vitro e in vivo de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (sacc & magn.) Briosi & cav., a fungicidas sistêmicos.** Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2009.

HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 16.1–16.22, 2018.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Indicadores IBGE - **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola.** Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/indicadores.html>>. Acesso em mai de 2021.

INDEX FUNGORUM. Hemileia. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=16158>>. Acesso em jun 2021.

ICO. INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Relatório sobre o mercado do café** – setembro de 2020. London: ICO, 2020. Disponível em: <<https://www.ico.org/pt/Market-Report-19-20-p.asp>>. Acesso em: jun de 2021.

ISHII, H; FRAAIJE, B. A; SUGIYAMA, T; NOGUCHI, K; NISHIMURA, K; TAKEDA, T; AMANO, T. HOLLOWOMON, D. W. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. **Phytopathology** 91:1166-1171, 2001.

KIM, Y.S.; DIXON, E.W.; VINCELLI, P.; FARMAN, M.L. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, n.7, p.891-900, 2003.

KIMATI, H. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 704p. 2011.

KLOSOWSKI, A.C.; BRAHM, L.; STAMMLER, G. Competitive Fitness of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates With Mutations in the CYP51 and CYTB Genes. **Phytopathology**. 106: 1278-1284. doi: 10.1094/PHYTO-01-16-0008-R. 2016.

KOGA, L.J.; CAMPOS, J.B.; FERREZIN, D.F.; GENET, J-L.; NGUGI, H.K. Spore germination bioassays for strobilurins (QoI) resistance monitoring in asian Soybean rust. **Mais Soja**. Set. 2018.

LEROUX, P.; ALBERTINI, C.; GAUTIER, A.; GRETT, M.; WALKER, A.-S. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, West Sussex, v.63, n.7, p.688-698, 2007.

MACIEL, J. L. N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. CABI Reviews - Perspectives in Agriculture, **Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Oxfordshire, v.6, n.50, p.1-8, 2011.

MAY DE MIO, L. L.; KLOSOWSKI, A. C.; MÜLLER, M. A. **XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas: biotecnologia aplicada a fitopatologia - Ferrugem asiática da soja: estudos sobre a sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. Lavras: 2018. 201.

MCGRATH, M.T. 2004. **What are Fungicides**. *The Plant Health Instructor*. Trans. Piérri Spolti, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01. 2012.

MESQUITA, C. et al. **Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (*Coffea arábica* L.)**. Belo Horizonte: EMATER-MG, 62p. 2016.

MUELLER, D. S.; WISE, K. A.; DUFAULT, N. S.; BRADLEY, C. A.; CHILVERS, M. I. Fungicides For Field Crops. **APS -The American Phytopathological Society**, Minnesota. 2017. Doi: 10.1094/9780890545065.

OLIVEIRA, R.F. Efeito fisiológico do F500 na planta. **Atualidades Agrícolas BASF S.A.**, p.9-11. 2005a.

OLIVEIRA, F. A. Tese (Doutorado em Fitopatologia). **Validação de modelos de previsão da ferrugem do cafeeiro e monitoramento de esporos de *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola***. Universidade Federal de Lavras, 98p, 2005b.

OLIVEIRA, S.C.; CASTROAGUDIN, V.L.; MACIEL, J.L.N.; PEREIRA, D.A.S.; CERESINI, P.C. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p.298-304, 2015.

PASCHE, J.S.; PICHE, L.M.; GUDMESTAD, N.C. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. **Plant Disease**, St. Paul, v.89, n.3, p. 269-78, 2005.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S. ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** V. 3, N.2, p. 25, 2009.

PERARO, M. B; POZZA, E. A, GILIOLI, F., SOUZA, P. E. Efeito do Mancozeb no controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro (*Coffea arabica*), em associação com fungicidas padrões, visando um melhor manejo de resistência às doenças e incremento de produtividade-safra 2015/2016. 2016.

PINTO, A. C. S.; POZZA, E. A.; SOUZA, P. E.; POZZA, A. A. A.; TALAMINI, V.; BOLDINI, J. M.; SANTOS, F. S. Descrição da epidemia da ferrugem do cafeeiro com redes neuronais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 517-524, set./out. 2002.

POZZA, E. A. Diagnose e controle de doenças. *In*: CARVALHO, G. R.; et al. **Cafeicultura do Cerrado**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2021, p. 347.

POZZA, E. A.; ALVES, M. C. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil. In REIS et al. Mudanças Climáticas. Impactos sobre doenças de plantas no Brasil. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, DF p. 214-233. 2008.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G; BALIZA, D. P. **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p 69-101.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. **Relação entre a nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas**. In: MACHADO, A. K. F. M. et al. (Ed.). Avanços da otimização no uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário. São Carlos: Suprema Grafica e Editora, 2012. p. 259-282.

REIS, E. M., FORCELINI, C. A., REIS, A. C. **Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. 4^{ed}, Editora Insular. Florianópolis, SC, 2001.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BIANCHIN, V. Control of plant disease by crop rotation. **Summa phytopathol.** vol.37 no.3 Botucatu July/Sept. 2011.

REKANOVIC, E.M.M.; POTOČNIK, I. In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiophanate-methyl. **Pesticides Phytomedicine**, Beograd, v.25, p.325-333, 2010.

RESENDE, M.L.V.; POZZA, E.A.; REICHEL, T.; BOTELHO, D.M.S. Strategies for Coffee Leaf Rust Management in Organic Crop Systems. **Agronomy** 2021, 11, 1865. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091865>.

RODRIGUES JR, C.J. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. **Fitopatologia Brasileira** 15: 5-9. 1990.

RODRIGUES JR, C.J.; BETTENCOURT, A.J. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology** 13: 49-70. 1975

SALCEDO-SARMIENTO et al. Elucidating the interactions between the rust *Hemileia vastatrix* and a *Calonectria* mycoparasite and the coffee plant. **iScience** 24, 102352 April 23, 2021.

SANTOS, L. A. Tese (Doutorado). **Resistência de *Cercospora coffeicola* a fungicidas**. Universidade Federal de Lavras, 70p, 2015.

SCHMITZ, H.K; MEDEIROS, C.A; CRAIG, I.R; STAMMLER, G. Sensivity of *Phakopsora pachyrhizi* toearns quinone-ouster-inhibitors and demethylation-inhibitors, and correponding resistance mechanisms. **Pest Manage. Sci.** 70:378-388. 2014.

SILVA, R. A. Caracterização de raças fisiológicas e análise de Proteínas candidatas a efetoras em população de *Hemileia vastatrix* no brasil. Tese doutorado. Viçosa Minas Gerais – Brasil.

SIMÕES, K.; HAWLIK A.; REHFUS A.; GAVA F.; STAMMLER G. First detection of a SDH variant with reduce SDHI sensivity in *Phakopsora pachyrhizi*. J. **Plant Dis. Prot.** doi: 10.1007/s41348-017-0117-5. 2017.

SOUSA, J. M. et al. **Brasil: números e desafios do gigante**. In: XIX International Symposium on Plant Disease Management. Plant Health in Tropical Agribusiness: The Numbers of the Giant. 2019.

SOUZA, P. E.; DUTRA, M.R. **Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas**. ed. UFLA, 2003. 174p.

STERGIOPOULOS, I; VAN NISTELROOY, J. G. M; KEMA, G. H. J; de WAARD, M. A. Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Manag Sci** 59:1333-1343, 2003.

TALAMINI, V.; POZZA, E. A.; SOUZA, P. E.; SILVA, A. M. Progresso da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro (*Coffea arabica*) com diferentes épocas de início e parcelamentos da fertirrigação. **Ciênc. agrotec.**, v. 27, n. 1, p. 141-149, jan./fev., 2003.

TALHINHAS, P., BATISTA, D., DINIZ, I., VIEIRA, A., SILVA, D. N., LOUREIRO, A., TAVARES, S., PEREIRA, A. P., AZINHEIRA, H. G., GUIMARAES, L. G., VARZEA, V., SILVA, M. D. C. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular plant pathology** DOI: 10.1111/mpp.12512. 2017.

THOMAZIELLO, R.A.; PEREIRA, S.P. **Poda e condução do cafeeiro arábica**. Campinas: IAC, 2008. 39p.

VALLIERI, C. TROUILLARD, M.; DUJARDIN, G.; MEUNIER, B. Deleterious Effect of the Qo Inhibitor Compound Resistance-Confering Mutation G143A in the Intron-Containing Cytochrome *b* Gene and Mechanisms for Bypassing. **Microbiology**. V. 77, n. 6, p- 2088 - 2093, 2011

VÁRZEA, V.M.P.; MARQUES, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. Coffee durable resistance. In: ZAMBOLIN, L.; ZAMBOLIN, E.M.; VÁRZEA, V.M. Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa MG, Brazil. Editora UFV. pp. 53-70. 2005.

VASCO, G. B. Análise espaço temporal da ferrugem do cafeeiro e sua relação com o clima e a nutrição mineral com K e B. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

VENANCIO, W.S.; RODRIGUES, M.A.T.; BEGLIOMINI, E; SOUZA, N.L. Physiological effects of strobilurim fungicides on plants. Publicatio UEPG – **Ciência Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia**, v.9, n.3, p.59-68, 2003.

VENÂNCIO, W.S.; RODRIGUES, M.A.T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N.L.
Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. **Publication UEPG**, Ponta Grossa, v. 9, n. 3, p. 59-68, 2004.

WELLMAN, F. L. The rust *Hemileia vastatrix* now firmly established on coffee in Brazil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 54, n. 7, p. 539-541, Sept. 1970.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR A GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Hemileia vastatrix* EM MICROPLACA DE “ELISA”

RESUMO: *Hemileia vastatrix* é um fungo biotrófico. Parasitas obrigatórios não crescem em meio de cultura, com isso, os testes ‘in vitro’ consistem em avaliar apenas a germinação dos esporos em placas de Petri. A possibilidade de utilizar placa de Elisa na avaliação de germinação de esporos traz várias vantagens, tornando o processo mais simples e econômico. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo validar a metodologia para realizar testes de germinação de esporos de *Hemileia vastatrix* em placas de Elisa, visando economia de espaço, materiais e maior agilidade na realização de experimentos. Foi viável realizar testes de germinação de uredósporos de *Hemileia vastatrix* em microplacas Elisa. A concentração da suspensão de esporos devem ser de 10^3 ou 10^4 e as melhores quantidades a serem depositadas na placa são de 150 a 250 microlitros, com 45% de germinação. As temperaturas de maior germinação foram 23°C combinada com 18 ou 24 horas de incubação e 25°C combinada com 10, 18 ou 24 horas de incubação, com germinação superior a 50%.

Palavras-Chave: Microplacas Elisa. *Hemileia vastatrix*. Cafeeiro. Germinação de Uredósporos.

ABSTRACT: *Hemileia vastatrix* is a biotrophic fungus. Obligatory parasites do not grow in culture medium, therefore, the in vitro tests consist in evaluating only the germination of spores using Petri dishes. The possibility of using the Elisa plate in the evaluation of spore germination brings several advantages that make the process simpler and more economical. Therefore, this work aimed to validate the methodology to perform germination tests of *Hemileia vastatrix* spores using Elisa plates, saving space, materials and greater agility in carrying out experiments. It was feasible to carry out germination tests of urediniospores of *Hemileia vastatrix* in Elisa microplates. The concentration of the spore suspension should be 10^3 or 10^4 and the best amounts to be deposited on the plate are 150 to 250 microliters, with 45% germination. The highest germination temperatures were 23°C combined with 18 or 24 hours of incubation and 25°C combined with 10, 18 or 24 hours of incubation, with germination higher than 50%.

Key words: Elisa Microplates. *Hemileia vastatrix*. Coffee tree. Uredospores germination.

1 INTRODUÇÃO

Causada por um fungo biotrófico, *Hemileia vastatrix*, agente etiológico da ferrugem alaranjada do cafeeiro é considerada a principal doença dessa cultura (Pozza et al., 2010).

Os patógenos denominados biotróficos, como os agentes causais das ferrugens e dos oídios, sobrevivem somente em tecidos vivos dos hospedeiros e não apresentam fase saprofítica. O principal mecanismo de sobrevivência dos patógenos biotróficos é o parasitismo de plantas hospedeiras (REIS; BIANCHIN, 2011). Parasitas obrigatórios ou biotróficos não crescem em meio de cultura e as fontes de inóculo devem consistir de plantas infectadas com o próprio patógeno. Com isso, os testes *in vitro* consistem em avaliar apenas a germinação dos esporos em placas de ‘Petri’ com meios de cultura mais pobres, como o ágar-água.

A realização de experimentos *in vitro* com *Hemileia vastatrix* em placas de ‘Petri’ se tornam obsoleto pois, para ser realizado há a necessidade de se utilizar grande quantidade de placas e, por sua vez, vão necessitar do preparo de meio de cultura. Isso torna o experimento lento, cansativo e caro, além de ocupar espaço dentro das BOD’s. Além do mais, a quantidade de resíduos a ser descartada será menor, resultando em menos impacto ambiental.

A germinação dos uredósporos de *Hemileia vastatrix* pode ocorrer apenas na presença de água líquida, seja no escuro ou em luz de baixa intensidade (NUTMAN et al, 1963). Para facilitar e agilizar a execução de experimentos *in vitro* com o fungo *Hemileia vastatrix* uma opção é utilizar placas Elisa com apenas água destilada, porém a metodologia não foi descrita para esse patógeno. Sendo assim, é necessário comprovar a sua eficiência e a sua confiabilidade, como também tornar conhecidas as condições ideais para serem executados os ensaios.

A utilização de placa de Elisa já foi descrita anteriormente para patógenos do gênero *Colletotrichum*, *Fusarium* (MARCONDES et al. 2014; BRAND, 2012) e *Aspergillus* (SOUZA, 2010), sendo comprovada a facilidade de avaliação de grandes quantidades de tratamentos. Utilizar placa de Elisa na avaliação de germinação de esporos traz várias vantagens como, a possibilidade de realizar vários tratamentos com apenas uma placa, necessidade de pequena quantidade de suspensão de esporos, substituição do meio de cultura por água destilada. Sendo assim, o processo se torna mais simples e econômico, além de proporcionar avaliação mais rápida e menos cansativa pois, é

possível observar a quantidade necessária de esporos para contagem sem trocar a objetiva do microscópio ou movimentar a placa. Dessa forma, a técnica é ideal para experimentos com diversos tratamentos e repetições, principalmente de fungos biotróficos, tornando viável e rápida a execução dos mesmos em ambiente otimizado.

Assim, esse trabalho teve como objetivo validar a metodologia para realizar testes de germinação de esporos de *Hemileia vastatrix* em placas de Elisa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e tratamentos

Para avaliar a técnica, foram realizados dois experimentos em microplacas de poliestireno de alta transparência para Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), contendo 96 poços de fundos chatos com capacidade de 360 microlitros (μ l) cada.

No primeiro experimento foi testada a concentração da suspensão de inóculo de *Hemileia vastatrix* em relação a quantidade de água destilada a ser colocada em cada poço da placa Elisa. Já no segundo experimento testaram-se diferentes temperaturas em relação a quantidade de horas de contato dos esporos com a suspensão.

Os experimentos I e II foram repetidos duas vezes ao longo do tempo, em datas diferentes para confirmar os resultados.

2.2 Obtenção do inóculo e preparo da suspensão

Foram coletadas aproximadamente 50 folhas de *Coffea arabica* com sinais de *Hemileia vastatrix* de uma lavoura localizada no Município de Lavras/MG e levadas ao Laboratório para realizar os experimentos. As folhas foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas na geladeira a 6°C para conservação até o momento da utilização, não ultrapassando 5 dias após a coleta para garantir a viabilidade dos esporos.

Para preparar a suspensão de esporos foi utilizado pincel de pintura (0,5x0,7cm) para varrer os uredósporos de *Hemileia vastatrix* em Becker de vidro de 100ml. Foram adicionados 60ml de água destilada esterilizada e 0,05% de Tween 80® ao Becker contendo os uredósporos e levado para agitar por 5 minutos em agitador magnético da marca Fisaton modelo 758 na velocidade 4. A concentração da suspensão foi ajustada em

Câmara de 'Neubauer'. As concentrações inferiores a 10^4 foram calculadas com a fórmula:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

No qual C_1 é a concentração inicial, V_1 é o volume inicial, C_2 é a concentração final e V_2 é o volume final.

2.2.1 Experimento I: Concentração x Quantidade da suspensão

Para avaliar a concentração em relação a quantidade de suspensão foi montado experimento em esquema fatorial de análise de variância 5×7 , sendo 5 concentrações e 7 quantidades de suspensão por poço da placa, totalizando 35 tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Tratamentos utilizados no experimento I. Concentração da suspensão de esporos em relação a quantidade de suspensão + água destilada depositada em cada poço da placa de Elisa. UFLA, Lavras/MG 2021.

Concentração	Quantidade de suspensão (µl)						
10^2	40	70	100	150	200	250	300
10^3	40	70	100	150	200	250	300
10^4	40	70	100	150	200	250	300
10^5	40	70	100	150	200	250	300
10^6	40	70	100	150	200	250	300

*Os poços da placa foram completados com água destilada até atingir o volume máximo de 300µl.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Cada poço da placa constituiu uma repetição onde foram avaliados 100 uredósporos.

Nas placas, anteriormente esterilizadas, foram adicionados os tratamentos e depositadas em bandeja de plástico e totalmente cobertas com papel alumínio para evitar a evaporação do líquido das placas e também a contaminação. Essas bandejas foram acondicionadas em BOD a 23°C por 18 horas no escuro (DEJONG et al. 1987; SALUSTIANO et al. 2008). Após esse período foram adicionadas duas gotas (25µl) de solução de lactoglicerol (Ácido láctico + Glicerol + Água destilada) para paralisar a germinação do fungo (BORGES et al. 2013).

2.2.2 Experimento II: Temperatura x Tempo

Para avaliar a temperatura em relação ao tempo incubação foi realizado experimento em esquema fatorial de análise de variância 3x7, sendo 3 temperaturas e 7 tempos de incubação totalizando 21 tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 - Tratamentos utilizados no experimento II. Temperaturas em relação ao tempo de incubação dos esporos. UFLA, Lavras/MG 2021.

Temperatura	Tempo de incubação (horas)						
	0	4	6	8	10	18	24
22°C	0	4	6	8	10	18	24
23°C	0	4	6	8	10	18	24
25°C	0	4	6	8	10	18	24

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Cada poço da placa constituiu uma repetição, onde foram avaliados 100 uredósporos.

De acordo com o experimento I, a concentração utilizada foi a de 10^4 esporos mL⁻¹ e a quantidade depositada na placa Elisa foi de 200µl de suspensão para 100µl de água destilada.

As placas com os tratamentos foram colocadas em bandejas de plástico e cobertas com papel alumínio separadamente, levadas para as respectivas BOD`s com as temperaturas programadas e mantidas no escuro. A solução de lactoglicerol, para paralisar a germinação, foi adicionada gradativamente nos tratamentos conforme as quantidades de horas de germinação previamente definidas.

Para diminuir as fontes de variações, as três placas de Elisa incubadas nas diferentes temperaturas/BOD`s foram preparadas no mesmo dia e com a mesma suspensão de esporos.

2.3 Avaliação da germinação

Após paralisar a germinação, foi realizada a contagem de 100 uredósporos em cada poço das placas no microscópio Labomed TCM 400, com capacidade de aumento em 400x. Foi considerado germinado o uredósporo com o comprimento do tubo germinativo superior ao seu tamanho.

2.4 Análise estatística

Os dados, de ambos os experimentos, foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk, para avaliar a distribuição normal dos resíduos e ao teste de Bartlett para homogeneidade. Após cumpridos os pré-requisitos, os dados foram submetidos a análise de variância em esquema fatorial. Realizou-se a análise conjunta dos experimentos repetidos no tempo para verificar se houve diferença entre os mesmos. As variáveis significativas para a interação, no teste F, foram submetidas ao teste de Scott-Knott, variáveis qualitativas, e ajustadas a modelos de regressão de superfície de resposta, variáveis quantitativas. As análises foram realizadas nos softwareR® (R Core Team, 2019), SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2019) e SigmaPlot versão 12.3 (Systat Software, San Jose, CA).

3 RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre os experimentos repetidos no tempo para as variáveis analisadas ($p < 0,05$). Portanto, utilizou-se a média dos valores desses experimentos.

3.1 Experimento I - Concentração x Quantidade de suspensão

Houve interação significativa entre as concentrações de inóculo e a quantidade de suspensão depositada em cada poço da placa ($p < 0,05$).

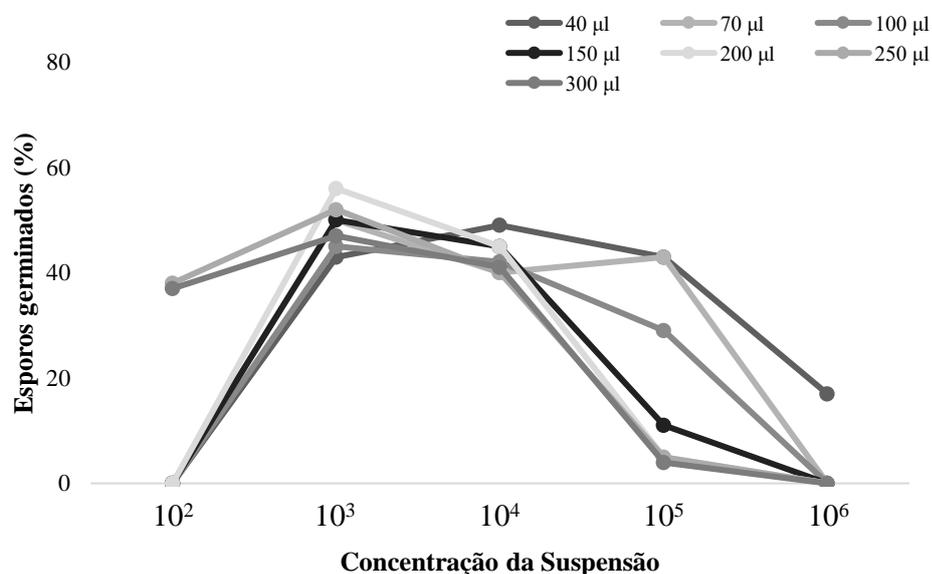
Tabela 3 - Porcentagem de esporos germinados do experimento I nas quantidades de suspensão e concentração testadas. UFLA, Lavras/MG 2021.

Quantidade de Suspensão	Concentração da suspensão				
	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
40 µl	0	43	49	43	17
70 µl	0	50	40	43	0
100 µl	0	45	42	29	0
150 µl	0	50	45	11	0
200 µl	0	56	45	5	0
250 µl	38	52	40	5	0
300 µl	37	47	41	4	0

Os maiores valores de esporos germinados ocorreram nos tratamentos com concentrações de 10^3 e 10^4 (Tabela 3), no qual obtiveram boa germinação dos uredósporos em todas as quantidades de suspensão depositadas na placa. Nas demais concentrações, 10^2 , 10^5 e 10^6 , não foram observadas porcentagens de germinação satisfatórias para testes *in vitro* pois, os valores foram zero ou muito próximos de zero, com ressalva para as menores quantidades de suspensão, 40µl, 70µl e 100µl, da concentração de 10^5 .

Conforme aumentaram as concentrações da suspensão houve o decréscimo da porcentagem de germinação (Figura 1).

Figura 1 - Representação gráfica da porcentagem de germinação em função de concentrações de uredósporos e da quantidade da suspensão depositada no poço da placa ELISA.UFLA, Lavras/MG 2021.



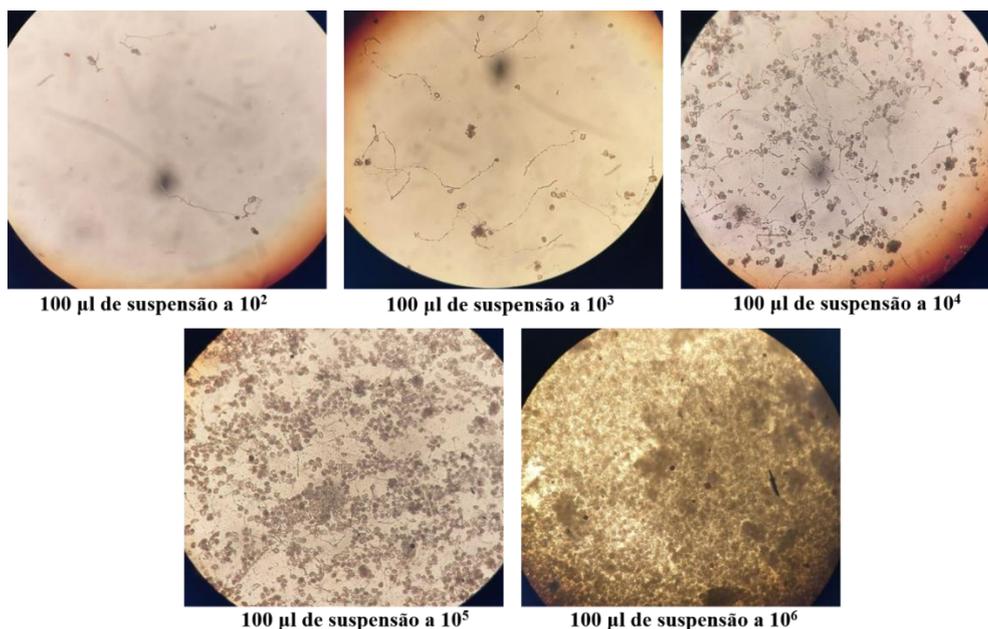
Para concentração de 10^2 a germinação encontrada foi mínima ou zero, isso se deve ao fato de a concentração ser muito baixa, portanto, não há esporos suficientes para contagem.

Nas concentrações de 10^3 e de 10^4 , foram obtidas as maiores germinações nas quantidades de 150, 200 e 250 microlitros, chegando a 56% de germinação na quantidade de 200ul, porém sem diferença estatística. Portanto, são as combinações indicadas para realizar experimentos *in vitro* em placas de Elisa. Não houve diferença estatística

($p < 0,05$) entre os valores de germinação das diferentes quantidades de suspensão depositadas nos poços da placa nas concentrações de 10^3 e 10^4 .

Conforme houve o aumento da concentração da suspensão a visualização no microscópio foi prejudicada, não sendo possível a correta identificação do tubo germinativo, devido a pequena distância entre os uredósporos (Figura 2).

Figura 2: Germinação dos uredósporos de *Hemileia vastatrix* no tratamento com 100µl de suspensão de esporos + 200µl de água destilada. Lavras/MG 2022.



3.2 Experimento II - Temperatura x Tempo

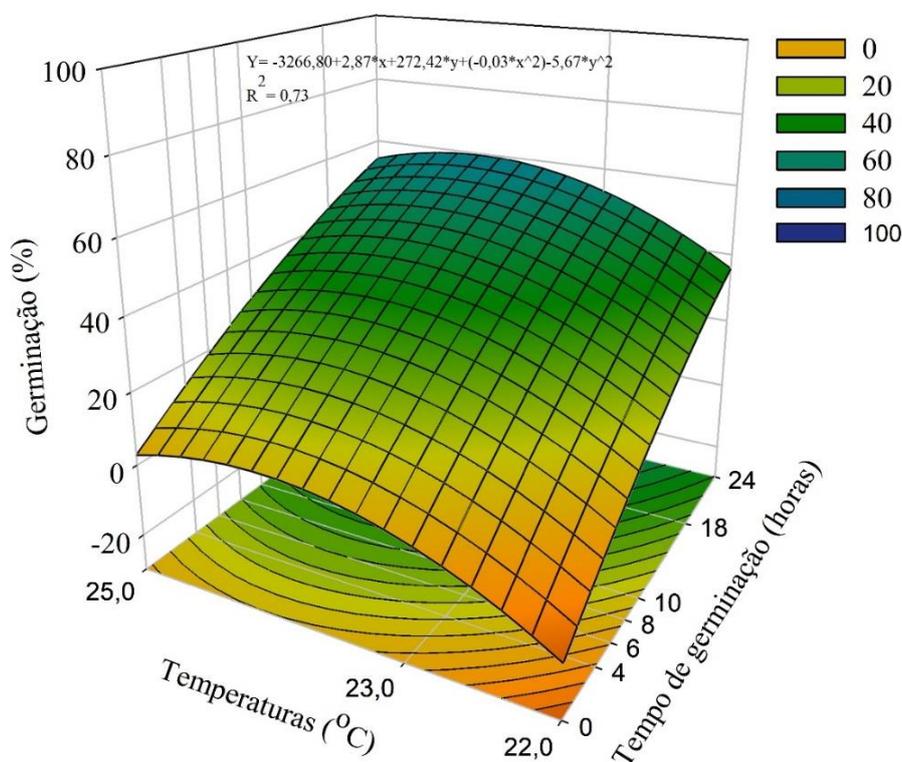
Houve interação significativa entre as temperaturas e o tempo de incubação ($p < 0,05$).

A maior porcentagem de germinação foi encontrada nas combinações entre as temperaturas de 23 e 25 graus Celsius e entre 18 e 24 horas de incubação chegando a 67% com 24 horas de germinação a 23°C. O tratamento com 10 horas de incubação a 25°C se destacou entre os demais por proporcionar germinação superior a 50% (Figura 3).

Conforme o aumento do tempo de incubação das placas com os tratamentos, houve o aumento da porcentagem de germinação. Os tratamentos 23 e 25 graus foram semelhantes, com boa porcentagem de germinação de esporos e apresentaram tendência

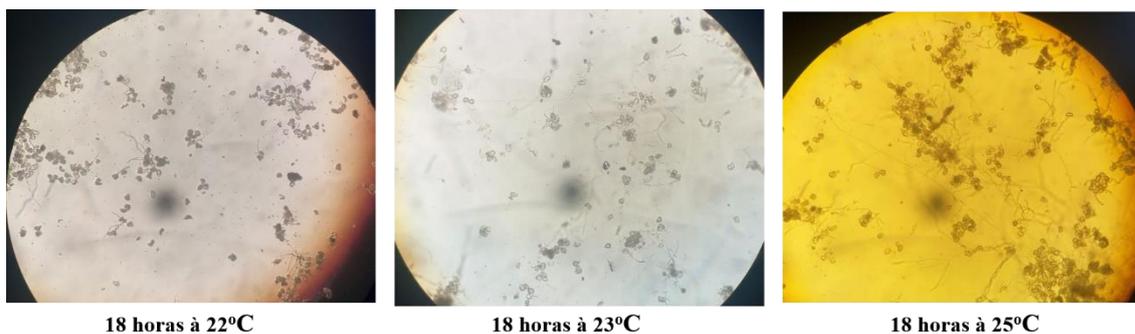
de aumento do menor para o maior tempo de incubação. A placa incubada em BOD a 22°C teve baixa porcentagem de germinação, em todos os tempos de incubação, sendo 19% o valor máximo de germinação nesta temperatura (Figura 3).

Figura 3 - Representação gráfica da Germinação de uredósporos de *H. vastatrix* em função da temperatura e do tempo de incubação. UFLA, Lavras/MG 2022.



Quando incubados a 25°C, os uredósporos de *H. vastatrix* apresentaram amplo crescimento do tubo germinativo se comparados com as demais temperaturas (Figura 4).

Figura 4 - Germinação dos esporos de *Hemileia vastatrix* nas três temperaturas testadas a 18 horas de incubação. Lavras/MG 2022.



18 horas à 22°C

18 horas à 23°C

18 horas à 25°C

Nas combinações com temperatura de 22 graus celsius, a germinação encontrada foi baixa, chegando apenas a 19% no maior tempo de incubação. O tratamento com 10 horas de incubação a 25 graus celsius foi o de maior porcentagem de germinação (Figura 3). De acordo com Nutman et al (1963), em meio ágar a temperatura ideal para germinação dos esporos de *Hemileia vastatrix* é 22°C, o mínimo 15°C e o máximo 28°C, em contrapartida, nas superfícies das folhas a germinação ideal é 24°C, resultando em uma relação bimodal com a temperatura. Essa teoria explica os resultados obtidos neste trabalho com os testes de temperatura. Nutman et al (1963) ainda relatam que após a submissão a temperaturas moderadamente baixas, segue-se um acentuado estímulo da germinação na transferência para o ótimo, sendo a quantidade do estímulo proporcional à duração da exposição à temperatura mais baixa.

Os resultados deste trabalho se aproximam dos obtidos nos experimentos realizados por Salustiano et al. (2008). Os autores testaram o efeito de diferentes temperaturas na germinação de 10 populações distintas de *Hemileia vastatrix* incubadas em lâminas contidas em caixa Gerbox. Segundo os autores, em um dos isolados, valores maiores de germinação nas temperaturas de 20-25°C, sendo os outros isolados com valor ótimo de germinação entre 25-30°C. Com relação ao crescimento do tubo germinativo, o valor máximo foi obtido na temperatura de 30°C.

Nas concentrações mais altas, 10^5 e 10^6 , as porcentagens de germinação também ficaram próximas de zero. Esse resultado pode ser explicado com a grande quantidade de esporos depositadas no poço da placa pois, isso pode levar a competição por espaço entre os uredósporos inibindo assim a germinação dos mesmos, bem como impedir a leitura ao microscópio. Outro fato ligado a baixa germinação dos esporos nas concentrações mais altas pode estar relacionado com a presença de auto inibidores da germinação nos esporos (STAHMANN et al, 1975; GARCIA et al, 2007)

De acordo com os resultados, a temperatura e o tempo de incubação podem ser definidos de acordo com a opção que melhor se encaixa nas condições do experimento a ser realizado.

Com os dados deste trabalho, é possível definir que a utilização de microplacas de 96 poços na realização de experimentos *in vitro* com o fungo *Hemileia vastatrix* pode ser considerada alternativa viável, devido sua praticidade e eficácia na condução de grandes experimentos em laboratório.

4 CONCLUSÕES

É viável realizar testes de germinação de uredósporos de *Hemileia vastatrix* em microplacas Elisa.

A concentração da suspensão de esporos devem ser de 10^3 ou 10^4 e as melhores quantidades a serem depositadas na placa são de 150 a 250 microlitros, com 45% de germinação.

As temperaturas de maior germinação foram 23°C combinada com 18 ou 24 horas de incubação e 25 °C combinada com 10, 18 ou 24 horas de incubação, com germinação superior a 50%.

REFERÊNCIAS

ALFONSI, W. M. V. Incubation period of coffee leaf rust. **Summa Phytopathologica**. vol.45 no.2 Botucatu, 2019.

BARBOSA JR, M. P. et al. Irrigação por gotejamento e manejo do fósforo no progresso da ferrugem do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 39-48, 2017.

BORGES, D. I.; ALVES, E.; MORAES, M. B.; OLIVEIRA, D. F. Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.3, p.325-331, 2013.

BRAND, S. C. (Dissertação-mestrado). **Isolamento e identificação de substâncias provenientes da laranjeira ‘Valência’ (*Citrus sinensis*) envolvidas no estímulo e/ou quebra da dormência de estruturas quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros**. Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, 104p, 2012.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>> Acesso em 02 de dez de 2020.

DEJONG, E. J.; ESKES, A. B.; HOOGSTRATEN, I. G. J.; ZADOKS, J. C. Temperature requirements for germination, germ tube growth and appressorium formation of urediniospores of *Hemileia vastatrix*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 93, n. 2, p. 61-71, Feb. 1987.

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 286-291, maio/jun. 2003.

GARCIA, E. O.; CASAGRANDE, M. V.; RAGO, A. M. MASSOLA JUNIOR, N. S. Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem

em cana-de-açúcar. **Summa phytopathol.** 33 (2). Jun 2007.
<https://doi.org/10.1590/S0100-54052007000200009>

MARCONDES, M.M.; MARCONDES, M. M.; BALDIN, I.; MAIS, A. J.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R. Influência de diferentes extratos aquosos de plantas medicinais no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Fusarium moniliforme*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.4, p.896-904, 2014.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M.; CLARKE, R.T. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Transactions of the British Mycological Society**, Volume 46, Issue 1, 1963, Pages 27-44. ISSN 0007-1536, [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80005-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80005-4).

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G; BALIZA, D. P. **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p 69-101.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. **Relação entre a nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas**. In: MACHADO, A. K. F. M. et al. (Ed.). **Avanços da otimização no uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário**. São Carlos: Suprema Gráfica e Editora, 2012. p. 259-282.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <<https://www.R-project.org/>>.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BIANCHIN, V. Control of plant disease by crop rotation. **Summa phytopathol.** vol.37 no.3 Botucatu July/Sept. 2011.

SALUSTIANO, M. E. S.; POZZA, E. A.; FERRAZ FILHO, A. C.; BOTELHO, A. O.; ALVES, E. Variability in ten populations of *Hemileia vastatrix* for germination and germinative tube length under four temperatures. Comunicação. **Ciênc. agrotec.** <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000500045>. out 2008.

SOUZA, L. P. (Dissertação- mestrado). **Potencial antifúngico de extratos de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries**. Universidade Federal de Lavras, 110p, 2010.

STAHMANN, M. A.; MUSUMECI, M. R.; MORAES, W. B.C. Germination of Coffee Rust Uredospore and Their Inhibition by Cinnamic Acid Derivatives. **Phytopathology**. nov 1975. 66:765-769.

ARTIGO 2

SENSIBILIDADE DE *Hemileia vastatrix* A ESTROBILURINAS

RESUMO

A ferrugem (*Hemileia vastatrix*) é considerada a doença de maior importância para a cafeicultura nacional e, dentre as medidas de manejo da doença, destaca-se a utilização de fungicidas do grupo químico das estrobilurinas, os inibidores da quinona (QoI's). Em outras culturas, a perda de sensibilidade de fungos a esses princípios ativos já foi identificada. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a sensibilidade de isolados de *Hemileia vastatrix* à fungicidas do grupo químico das estrobilurinas. Foram realizados experimentos 'in vitro', em casa de vegetação e em campo. O experimento 'in vitro' foi realizado em microplacas Elisa, com 21 isolados de *H. vastatrix* e 7 concentrações diferentes de fungicidas, com os princípios ativos piraclostrobina, azoxistrobina, picoxistrobina, hidróxido de cobre e mancozebe, a fim de identificar a dose letal para inibir 50% da germinação (Ec50) e a dose resposta ideal para testes de sensibilidade *in vitro*. Nos experimentos em casa de vegetação e em campo foi utilizado a dose dos fungicidas registrada para controle da ferrugem e foi avaliada a incidência e a severidade da doença. Os dados foram integralizados em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Nos resultados *in vitro*, as populações de *Hemileia vastatrix* testadas foram sensíveis às estrobilurinas azoxistrobina, piraclostrobina e picoxistrobina, porém, há diferença nos níveis de sensibilidade. A dose de 128 ppm ou mg/Kg de ingrediente ativo pode ser usada como dose resposta para testes de sensibilidade de *Hemileia vastatrix* à estrobilurinas. Em condições de casa de vegetação não foram observados dados relevantes com relação a sensibilidade dos isolados. Já para os testes a nível de campo o fungicida com ativo azoxistrobina foi menos eficiente em relação as demais estrobilurinas testadas.

Palavras-Chave: Cafeeiro. *Hemileia vastatrix*. Ferrugem. Sensibilidade. Estrobilurinas. Controle Químico.

SENSITIVITY OF *Hemileia vastatrix* to STROBILURINS

ABSTRACT

Rust (*Hemileia vastatrix*) is considered the most important disease for the national coffee industry and, among the disease management measures, the use of strobilurin fungicides (quinone inhibitors - QoI) stands out. In other cultures, the resistance of fungi to these active principles has already been identified. Thus, the objective of this work was to identify the sensitivity of *Hemileia vastatrix* isolates to QoI fungicides. For this, *in vitro*, greenhouse and field experiments were carried out. The *in vitro* experiment was carried out in microplates, with 21 isolates of *Hemileia vastatrix* and 7 different doses of fungicides with active ingredient pyraclostrobin, azoxystrobin, picoxystrobin, copper hydroxide and mancozeb, in order to identify a lethal dose to inhibit 50% of germination (Ec50) and an ideal dose for *in vitro* susceptibility testing. In the experiments in the greenhouse and in the field, the dose of fungicides registered to control rust was used and the incidence and severity of the disease were evaluated. Data were integrated in an area under the disease progress curve (AUDPC) and were compared using the F test of the analysis of variance. In the *in vitro* results, the populations of *Hemileia vastatrix* tested were sensitive to the strobilurins azoxystrobin, pyraclostrobin and picoxystrobin, however, there is a difference in the levels of sensitivity. A dose of 128 ppm or mg/kg of active ingredient can be used as a dose response for testing the sensitivity of *Hemileia vastatrix* to strobilurins. Under greenhouse conditions, no relevant data regarding the sensitivity of the isolates were observed. As for the field tests, the fungicide with the active azoxystrobin was less efficient in relation to the other strobilurins tested.

Key words: Coffee. *Hemileia vastatrix*. Rust. Sensitivity. Strobilurins. Chemical Control.

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Hemileia vastatrix* é o agente causal da principal doença da cultura do café, conhecida como ferrugem do cafeeiro. O Brasil é o maior produtor mundial de café e mais de 80% da produção nacional está concentrada na região Sudeste (IBGE, 2021).

As perdas de produção atribuídas a essa doença são devidas a desfolha prematura e a redução da área fotossintética da planta, com conseqüente morte dos ramos plagiotrópicos, tornando seu cultivo antieconômico, comprometendo a safra futura. Os sinais da doença aparecem na parte abaxial das folhas de café e é caracterizado por aspecto pulverulento de coloração alaranjada (POZZA et al., 2010).

O manejo adequado é essencial para controlar a ferrugem e o uso de cultivares resistentes é o mais indicado, porém, mais de 80% da área plantada no território nacional tem cultivares suscetíveis à doença. Ainda plantadas por sua rusticidade e resistência a intempéries climáticas e serem produtivas sob manejo para altas produtividades. Com isso, ocorre o aumento na frequência de pulverizações de fungicidas. Caso seja utilizado o mesmo grupo químico com frequência pode ocorrer a seleção de populações resistentes.

Para controlar a ferrugem recomenda-se a utilização de fungicidas de forma preventiva ou a partir do início dos sinais (POZZA, 2021). Entre os grupos químicos recomendados para o controle estão as estrobilurinas e os triazóis, geralmente aplicados em mistura (FRAC-BR, 2021). Porém, embora sejam eficientes no controle, seu modo de ação é específico e isso aumenta as chances de ocorrer resistência. As estrobilurinas são moléculas de sítio específico e agem como inibidoras da quinona oxidase (QoI). Atuam na cadeia respiratória, no Complexo III, inibindo a respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o c1, interferindo na produção de ATP (FRAC, 2012).

O termo resistência a fungicidas é usado para definir a redução da sensibilidade, por meio de mecanismos de variabilidade, como a mutação, de populações de fungos anteriormente sensíveis ao fungicida (EUROPEAN, 1988; SANTOS, 2015). O mecanismo mais comum de resistência é a alteração do sítio alvo dos fungicidas, ocasionada por mutações genéticas (BRENT e HOLLON, 2007).

Perda da sensibilidade à estrobilurinas está normalmente associada a mutação no gene do citocromo b (cytb) por meio da substituição do aminoácido glicina por alanina no códon 143 (G143A) (CASTROAGUDIN et al., 2015). Outra mutação pode ocorrer no gene cytb, de fenilalanina para leucina na posição 129 (F129L) ligada a resistência de fungos a QoI (GISI et al., 2002; GRASSO et al., 2006), incluindo *Phakopsora pachyrhizi* na soja (KLOSOWSKI et al., 2016; MAY DE MIO et al., 2018). Além disso, a resistência

de fungos a QoI pode estar associada a redução da absorção ou aumento do efluxo do fungicida, a falta de conversão para o composto ativo e detoxificação da molécula fungicida (HAWKINS; FRAAIJE, 2018).

Embora a informação sobre a resistência de *H. Vastatrix* seja escassa, há registros da ocorrência da resistência em outros fungos (SALCEDO-SARMIENTO et al., 2021). A resistência do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem da soja, a fungicidas do grupo dos DMI (triazóis) e dos QoI (estrobilurinas) já foi relatada no Brasil por Schmitz et al. (2014); klosowski et al. (2016) e Simões et al. (2017). Santos et al. (2015) constataram redução na sensibilidade a estrobilurina em isolados do fungo *Cercospora coffeicola*, agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro, proveniente do estado da Bahia. Alguns aspectos do patossistema *H. vastatrix*, como a variabilidade genética e a produção de grande quantidade de esporos, contribuem para aumentar as chances de ocorrer resistência, com isso, fica a dúvida se a resistência a fungicidas também ocorre para *Hemileia vastatrix* (BRAGANÇA, 2010).

Considerando o uso de fungicidas no controle da ferrugem do cafeeiro e a possível redução da eficiência das moléculas disponíveis no mercado, objetivou-se com este trabalho identificar a sensibilidade de diferentes isolados de *Hemileia vastatrix* a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas e também encontrar a dose resposta ideal para testes *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e tratamentos

Foram realizados três ensaios. O primeiro, *in vitro*, em condições controladas, o segundo, *in vivo*, com mudas de café em casa de vegetação, no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil, latitude 21°13'40.18"S e longitude 44°57'44.28"O, e o terceiro em campo em propriedade particular localizada no município de Varginha/MG, latitude 21°37'25.26"S e longitude 45°23'37.17"O. Os experimentos tiveram como fonte principal dos tratamentos três fungicidas sistêmicos do grupo das estrobilurinas mais um fungicida a cúprico e outro a base de mancozebe, para comparar a sensibilidade dos isolados do fungo da ferrugem do cafeeiro aos fungicidas estudados. (Tabela 1).

Tabela 1 - Ingredientes ativos dos tratamentos utilizados nos três experimentos (*in vitro*, casa de vegetação e campo). UFLA 2022.

Ingrediente Ativo	Nome Comercial	Conc. i.a(g/l ou g/kg)	Dose Comercial/ha	Dose comercial (ppm)
Piraclostrobina	Comet [®]	250	0,7L	437,5
Azoxistrobina	Amistar [®]	500	0,1 kg	125,0
Picoxistrobina	Oranis [®]	200	0,45L	225,0
Hidróxido de cobre	Supera [®]	538	2,0 L	1.075,0
Mancozebe	Manzate [®]	750	3,0 kg	2.250,0

i.a. Ingrediente Ativo; Conc. Concentração. Considerou-se volume de calda para 400 litros por hectare. Foi adicionado o adjuvante Ochima a 0,25% em todos os produtos.

2.2 Experimento *In Vitro*

Para verificar a influência dos fungicidas na germinação dos uredósporos de *H. vastatrix*, realizou-se teste *in vitro*, em microplacas de 96 poços (ELISA), com capacidade de 360µL por cavidade. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5 x 6 + 1 testemunha adicional (apenas água destilada + suspensão de esporos) e 4 repetições, totalizando 30 tratamentos mais testemunha. Os 5 fungicidas (Tabela 1) constituíram o fator A e as concentrações (0,125; 0,5; 2,0; 8,0; 32 e 128 ppm ou mg/kg i.a) o fator B. Cada cavidade da placa foi considerada uma parcela experimental.

Inicialmente os tratamentos foram diluídos em água destilada esterilizada, para fazer a solução e a suspensão estoque. Para isso foi pipetado, de cada um dos fungicidas, as quantidades de 1.000 e 250µl e diluídas em 1 litro de água. A partir da suspensão estoque os tratamentos foram depositados na placa de Elisa, nas concentrações previamente definidas. A quantidade de suspensão estoque, de cada tratamento (Anexo A), depositada nos poços da placa foi obtida a partir da fórmula:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

No qual C_1 é a concentração inicial, V_1 é o volume inicial, C_2 é a concentração final e V_2 é o volume final.

Completo-se o poço da placa com suspensão de esporos na concentração de 10^4 até a quantidade máxima de 300µl por poço.

As placas foram mantidas em BOD à $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 horas, em escuro total. Após esse período, foram adicionados 25 µL de lactoglicerol para paralisar a germinação

dos uredósporos. Foram avaliados 50 uredósporos aleatoriamente de cada repetição da placa de microtitulação no microscópio Labormed TCM 400 de objetiva invertida no aumento de 10 vezes. Os uredosporos foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo foi superior ao seu tamanho. Os valores da germinação foram transformados em porcentagem e usados para encontrar a dose letal para inibir 50% da germinação (Ec50) utilizando o programa ED50Plus v1.0.

O experimento *in vitro* foi realizado com 21 isolados diferentes de *Hemileia vastatrix* coletados na região, sendo dois deles, ALP e SAA2, de lavouras orgânicas, ou seja, não tiveram contato com produtos químicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Isolados utilizados no experimento *in vitro*. UFLA 2022.

Código dos Isolados	Município	Coordenadas Geográficas
1 ALP	Alpinópolis - MG	20°46'13.26"S / 46°22'34.63"O
2 BOE	Boa Esperança	21° 5'55.40"S / 45°34'45.50"O
3 BSS	Bom Sucesso - MG	21° 5'58.82"S / 44°51'47.61"O
4 CCH	Carmo da Cachoeira - MG	21°28'47.80"S / 45°11'59.90"O
5 CRC	Carmo do Rio Claro - MG	20°59'21.75"S / 46° 7'38.06"O
6 ELM	Elói Mendes - MG	21°38'13.80"S / 45°30'56.50"O
7 FRN	Franca - SP	20°29'50.18"S / 47°29'23.44"O
8 IJC	Ijací - MG	21°15'22.70"S / 44°55'5.85"O
9 ITU	Itumirim - MG	21°18'11.65"S / 44°54'12.30"O
10 LAV	Lavras - MG	21°13'40.18"S / 44°57'44.28"O
11 SER	Serrania - MG	21°31'11.18"S / 46° 2'35.38"O
12 OLI 1	Oliveira-MG	20°50'10.50"S / 44°46'59.10"O
13 OLI 2	Oliveira-MG	20°49'51.80"S / 44°49'31.10"O
14 SAA 1	Santo Antônio do Amparo - MG	20°53'27.36"S / 44°58'11.61"O
15 SAA 2	Santo Antônio do Amparo - MG	20°53'5.19"S / 44°57'13.72"O
16 STG 1	São Tiago -MG	20°48'29.28"S / 44°34'5.02"O
17 STG 2	São Tiago -MG	20°48'37.56"S / 44°34'24.11"O
18 TCO 1	Três Corações - MG	21°40'6.56"S / 45°23'23.90"O
19 TCO 2	Três Corações - MG	21°35'47.87"S / 45°13'28.73"O

20 VGA 1	Varginha - MG	21°37'25.26"S / 45°23'37.17"O
21 VGA 2	Varginha - MG	21°34'10.36"S / 45°23'56.49"O

Para inibir a via alternativa da oxidase adicionou-se 100 µg mL⁻¹ de ácido salicílico (SHAM) nos controles e tratamentos com fungicidas QoI (KOGA et al, 2018).

O cálculo do Ec50 foi realizado utilizando o programa ED50plusv1.0 desenvolvido por Vargas (2000) com o software Excel®.

2.2.1 Obtenção do inóculo e preparo da suspensão

Foram coletadas aproximadamente 50 folhas de *Coffea arabica* infectadas com *Hemileia vastatrix*, com sinais típicos da doença, de cada isolado descrito na Tabela 2. As folhas foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas na geladeira a 5°C para conservação até o momento da utilização, não ultrapassando 3 dias após a coleta, para garantir a viabilidade dos esporos.

Para preparar a suspensão de esporos foi utilizado pincel de pintura para varrer os uredósporos de *Hemileia vastatrix* em becker de vidro de 100ml. Foram adicionados 60ml de água destilada esterilizada e 0,05% de Tween 80® ao Becker, contendo os uredósporos e levado para agitar por 5 minutos em agitador magnético na velocidade 4. A concentração da suspensão foi ajustada para 1x10⁴ uredósporos de *Hemileia vastatrix*/ml em Câmara de Neubauer, conforme estabelecido no Artigo 1 deste trabalho.

Após o teste de germinação, os uredósporos das folhas, dos 21 isolados, foram raspados e encapsulados. As capsulas contendo os esporos foram colocadas em ‘eppendorfs’ devidamente identificados e armazenadas a -80°C para manter a viabilidade dos mesmos.

2.3 Experimento *In Vivo*: Mudanças

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com temperatura de 25°C ± 3°C. As mudas de café da cultivar Catuaí Vermelho IAC-144, suscetíveis à

ferrugem, foram adquiridas de viveiro comercial. O experimento foi instalado no delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com sete tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram os 5 fungicidas usados no teste *in vitro* na dose comercial mais 1 testemunha, somente com água e foi usado um fungicida com mistura triazol/estrobilurina (epoxiconazol + piraclostrobina) na dose de 1,5L/ha, o Opera, da Basf®. As vinte e oito parcelas (28) parcelas experimentais foram compostas por duas mudas em saquinhos de polietileno (10 x 20cm). Os tratamentos foram aplicados nas folhas das mudas dois dias antes da inoculação dos esporos de *Hemileia vastatrix*.

O experimento foi realizado com os isolados VGA1, VGA2, CRC, TCO1 e LAV. Foi avaliada a incidência e a severidade da doença, descritas no item 2.5, a partir do início da detecção dos sinais, a cada 6 dias, totalizando 7 amostragens.

Os dados foram integralizados em área abaixo da curva de progresso da doença (SHANER; FINNEY, 1977).

2.3.1 Obtenção do inóculo e inoculação

Aproximadamente 400 folhas de *Coffea arabica* naturalmente infectadas foram coletadas no campo e levadas no mesmo dia para o Laboratório, onde foram colocadas em bandejas e lavadas com água destilada e esterilizada para remover os uredósporos. Após lavagem das folhas, a suspensão de uredósporos foi depositada em ‘becker’ de vidro, na quantidade de 1.000ml. A suspensão obtida foi ajustada em Câmara de ‘Neubauer’ para a concentração de 1×10^5 uredosporos/mL e aplicada com pulverizador plástico manual na face abaxial de todas as folhas das mudas de cafeeiro até o ponto de escorrimento (CRUZ FILHO; CHAVES, 1973). Em seguida, as mudas foram cobertas com sacos plásticos pretos por 72 horas para fornecer as condições ideais à penetração do fungo, como a ausência de luz, o molhamento foliar e a temperatura em torno de 23°C (RAYNER et al.; KUSHALAPPA et al., 1989). Após 72 horas os sacos plásticos foram retirados e as mudas colocadas em bancada na casa de vegetação a $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, seguindo o delineamento em blocos casualizados.

A irrigação das mudas foi realizada duas vezes ao dia de forma automática com gotejadores de 4mm para vasos da marca Amanco® e para evitar que houvesse contaminação por outros esporos de *Hemileia vastatrix*, colocou-se uma barreira de lona plástica transparente ao redor de cada experimento.

2.4 Experimento *In Vivo*: Campo

O experimento em campo foi realizado na Fazenda Palmela, localizada no município de Varginha-MG, 21°37'25.26"S, 45°23'37.17"O, altitude de 898 metros, em lavoura formada por plantas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo linhagem 376/4 em fase de produção, no espaçamento de 3,5 m entre linhas e 0,9 m entre plantas, com 21 anos de idade. O experimento foi conduzido por dois anos, implantado em novembro de 2019 e finalizado em maio de 2021.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições e com os mesmos sete tratamentos do experimento em casa de vegetação, perfazendo 28 parcelas experimentais. Cada parcela experimental foi constituída por oito plantas, sendo as seis plantas centrais a parcela útil. Realizaram-se 3 aplicações dos tratamentos, em cada ano, com início em novembro e com intervalo de 45 dias. As avaliações da incidência foram realizadas mensalmente, sendo a primeira realizada antes da aplicação dos tratamentos.

Para aplicar os tratamentos, utilizou-se um pulverizador costal motorizado da marca STIHL® modelo SR 430 com quantidade de vazão média de 1,5 L/min. O volume de calda utilizado para todos os tratamentos foi de 400 L.ha⁻¹. As caldas foram preparadas na área experimental ao final da tarde e imediatamente pulverizadas. Utilizou-se como adjuvante o óleo vegetal Ochima® - 0,25%.

Foi realizada a colheita e definida a produção em sacas por hectare, nos dois anos de condução do experimento. A incidência foi comparada quanto a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) segundo a equação de Shaner e Finney (1977) e de eficiência de Abbott (1925).

Foram coletadas folhas da lavoura deste experimento para realização dos experimentos *in vitro* e em casa de vegetação, o qual recebeu denominação de VGA1.

2.5 Avaliação da incidência e da severidade

No experimento em casa de vegetação foram avaliadas 8 folhas por muda, marcou-se com fita para padronizar a avaliação sempre nas mesmas folhas. No experimento de campo as folhas foram avaliadas aleatoriamente por método não

destrutivo, no terço médio da planta, entre o primeiro e o segundo pares de folhas dos ramos plagiotrópicos, sendo amostradas 12 folhas por planta, nas 6 plantas úteis, totalizando 72 folhas.

A incidência foi obtida por meio da fórmula de Campbell e Madden (1990).

Equação para cálculo da incidência:

$$I(\%) = \left(\frac{\text{NFD}}{\text{NTF}} \right) * 100$$

No qual: I (%) = incidência da ferrugem;

NFD = número de folhas doentes;

NTF = número total de folhas amostradas.

A severidade da doença foi obtida com a escala diagramática proposta por Cunha et. Al., (2001).

Tabela 3 - Escala diagramática para ferrugem do cafeeiro. UFLA 2022.

Nota	Grau de severidade (%)
1	0 – 3
2	3 – 6
3	6 – 12
4	12 – 25
5	25 – 50
6	< 50

*Adaptado de Cunha et. Al., (2001)

2.6 Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e eficácia (E%)

Os dados das avaliações foram integralizados em Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), segundo fórmula proposta por Shaner & Finney (1977).

$$AACP = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (T_{i-1} - T_i)$$

No qual:

AACP= área abaixo da curva de progresso da doença;

Y_i = proporção da doença na i -ésima observação;

T_i = tempo em dias na i -ésima observação;

n = número total de observações.

A eficácia foi calculada entre os tratamentos por meio da equação de Abbott (1925).

$$E\% = \left(1 - \frac{n \text{ no } T \text{ após tratamento}}{n \text{ no } Co \text{ após tratamento}} \right) \times 100$$

No qual:

n = Incidência da doença;

T = Tratamento com fungicida;

Co = Controle

2.7 Análise estatística

A porcentagem da germinação dos esporos, os valores da E_{c50} , as avaliações da incidência e da severidade da ferrugem em mudas e no campo e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram comparadas no teste F da análise de variância.

Foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, para avaliar a distribuição normal dos resíduos e o teste de Barlett para homogeneidade. As análises foram realizadas no software R[®] (R Core Team, 2019) e SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2019). As variáveis significativas no teste F, foram submetidas ao teste de Scott-Knott quando qualitativas, e as quantitativas ajustadas a modelos de regressão. As análises foram realizadas nos softwares R[®] (R Core Team, 2019), SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2019) e SigmaPlot versão 12.3 (Systat Software, San Jose, CA).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação *in vitro* da germinação dos esporos de *Hemileia vastatrix*

Houve diferença significativa ($p < 0,05$), para a sensibilidade à fungicidas, entre os isolados nas maiores doses dos fungicidas. Na dose de 32 ppm, 50% dos isolados tiveram germinação zero ou muito próxima de zero (Tabela 5). Porém, os demais variaram de 1 a 20% de germinação. Já a 128 ppm apenas 5 dos 20 isolados apresentaram germinação acima de zero, variando de 1 a 6% de germinação. Os tratamentos com hidróxido de cobre e mancozebe obtiveram os menores índices de germinação entre os isolados, mesmo em doses próximas de 10% das empregadas em campo.

Dos isolados com diferença na sensibilidade, os maiores valores de germinação foram do CCH, ITU, FRN, ELM, BSS, SAA1 e VGA2, chegando a 20% de germinação. O tratamento com picoxistrobina teve menor inibição da germinação dos esporos, seguido do tratamento com piraclostrobina e azoxistrobina, respectivamente (Tabela 5). Na dose de 128 ppm, 6 (CCH, ITU, ELM, BSS, SAA1 e VGA2) dos 21 isolados apresentaram germinação acima de 0%, ou seja, há variação na sensibilidade à fungicidas entre os isolados. No tratamento com azoxistrobina apenas o isolado BSS obteve diferença estatística em relação aos demais, com 5% de germinação. Devido a essa dose se aproximar a da utilizada em campo (125 mg/L). No tratamento piraclostrobina os isolados ELM, VGA2, SAA1 e BSS diferiram dos demais com 1,3; 2,0; 3,0 e 3,0% de germinação, respectivamente. Já, para picoxistrobina, os isolados VGA2, SAA1 e BSS apresentaram diferença estatística em relação aos demais isolados com 2,7; 3,0 e 6% de germinação (Tabela 5).

Tabela 5 - Média da porcentagem de germinação dos esporos de cada isolado em função dos fungicidas nas doses de 32 e 128 ppm de ia. UFLA, 2022.

Isolados	Tratamentos (32 ppm)					Tratamentos (128 ppm)				
	Mancozebe	Hidróx. de Cobre	Azoxistrobina	Piraclostrobina	Picoxistrobina	Mancozebe	Hidróx. de Cobre	Azoxistrobina	Piraclostrobina	Picoxistrobina
ALP	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
BOE	0,0 a	0,0 a	2,0 b	2,0 a	1,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
BSS	2,0 b	2,0 b	10,0 d	10,0 b	20,0 e	1,0 b	2,0 b	5,0 b	3,0 c	6,0 c
CCH	0,0 a	0,0 a	2,0 b	2,7 a	6,0 b	0,0 a	0,0 a	0,7 a	1,3 b	0,7 a
CRC	1,0 b	0,0 a	0,0 a	2,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
ELM	0,0 a	2,7 b	4,0 b	2,7 a	6,0 b	0,0 a	0,7 a	0,7 a	1,3 b	1,3 a
FRN	1,0 b	1,0 a	6,0 c	1,0 a	6,0 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a	1,0 a	0,0 a
IJC	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,7 a	0,7 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
ITU	0,7 b	6,7 c	2,0 a	2,0 a	5,3 b	0,0 a	0,7 a	1,3 a	0,0 a	0,7 a
LAV	1,0 b	3,0 b	1,0 a	3,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	1,0 a	0,0 a	0,0 a
SER	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,7 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
OLI1	0,7 b	0,0 a	0,7 a	0,0 a	2,0 a	0,7 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
OLI2	0,0 a	0,0 a	1,3 b	2,0 a	4,7 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
SAA1	0,0 a	2,0 b	8,0 d	17,0 c	15,0 d	0,0 a	2,0 a	2,0 a	3,0 c	3,0 b
SAA2	0,0 a	0,0 a	0,7 a	0,0 a	0,7 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
STG1	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,7 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
STG2	0,0 a	0,0 a	1,3 b	2,0 a	2,7 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
TCO1	0,0 a	2,0 b	2,0 b	1,3 a	2,0 a	0,0 a	0,7 a	0,0 a	0,0 a	0,7 a
TCO2	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,7 a	0,7 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
VGA1	1,0 b	0,0 a	0,0 a	1,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
VGA2	0,0 a	1,3 a	2,7 b	2,7 a	10,0 c	0,0 a	0,7 a	0,7 a	2,0 b	2,7 b

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Embora tenha ocorrido diferença entre os isolados em relação a sensibilidade, somente na dose de 128 ppm não houve variação entre os fungicidas ($p < 0,05$), sendo a germinação próxima de zero. Para a dose de 32ppm houve diferença entre os fungicidas no isolado de Bom Sucesso (BSS), chegando a 20% de germinação no tratamento com picoxistrobina e 10% nos tratamentos azoxistrobina e piraclostrobina. Na dose de 8ppm houve diferença entre os fungicidas em 7 dos isolados, BSS, CCH, ITU, LAV, OLI2, TCO1 e VGA2, sendo o maior percentual de germinação, 34%, encontrado no tratamento com picoxistrobina. Nas menores doses, 0,125 e 0,5ppm houve diferença entre os fungicidas em praticamente todos os isolados e os melhores tratamentos foram o Hidróxido de Cobre e Azoxistrobina seguidos por mancozebe, piraclostrobina e picoxistrobina, respectivamente. Os controles, 0 ppm de i.a., obtiveram índices de germinação superiores aos demais (Tabela 6).

Tabela 6 - Germinação de esporos (%), dos isolados de *Hemileia vastatrix*, em função de doses dos diferentes fungicidas testados. UFLA, 2022.

	Doses (ppm de i.a)						
	0	0,125	0,5	2	8	32	128
ALP							
Mancozebe	56 a	61 c	37 c	2 c	0 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	56 a	54 b	6 e	0 c	0 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	56 a	45 b	17 d	4 c	1 a	0 a	0 a
Piraclostrobina	56 a	54 b	49 b	33 a	1 a	0 a	0 a
Picoxistrobina	56 a	57 a	54 a	44 b	2 a	0 a	0 a
BOE							
Mancozebe	53 a	51 a	39 a	26 a	2 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	53 a	48 a	34 a	4 c	1 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	53 a	29 c	25 b	14 b	4 a	2 a	0 a
Piraclostrobina	53 a	17 d	14 c	9 c	2 a	2 a	0 a
Picoxistrobina	53 a	39 b	32 a	14 b	6 a	1 a	0 a
BSS							
Mancozebe	51 a	48 a	49 a	38 a	5 d	2 c	1 a
Hidróx. de Cobre	51 a	39 b	20 d	6 d	4 d	2 c	2 a
Azoxistrobina	51 a	44 a	26 c	23 c	13 c	10 b	5 a
Piraclostrobina	51 a	46 a	41 b	30 b	19 b	10 b	3 a
Picoxistrobina	51 a	45 a	40 b	37 a	34 a	20 a	6 a
CCH							
Mancozebe	53 a	65 a	38 a	33 a	0 c	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	53 a	53 b	7 c	1 d	0 c	0 a	0 a
Azoxistrobina	53 a	46 c	19 b	11 c	5 b	2 a	1 a
Piraclostrobina	53 a	47 c	41 a	29 b	11 a	3 a	1 a
Picoxistrobina	53 a	51 b	43 a	37 a	15 a	6 a	1 a
CRC							
Mancozebe	47 a	50 a	52 a	17 a	2 a	1 a	0 a
Hidróx. de Cobre	47 a	12 b	5 b	1 b	0 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	47 a	8 b	6 b	4 b	1 a	0 a	0 a
Piraclostrobina	47 a	13 b	7 b	4 b	4 a	2 a	0 a
ELM							
Mancozebe	33 a	48 a	31 a	13 a	2 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	33 a	29 c	19 b	11 a	10 a	3 a	1 a
Azoxistrobina	33 a	27 c	19 b	9 a	5 a	4 a	1 a

Piraclostrobina	33 a	38 b	17 b	11 a	5 a	3 a	1 a
Picoxistrobina	33 a	30 c	19 b	13 a	6 a	6 a	1 a
FRN	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	71 a	56 a	29 b	33 a	3 a	1 a	0 a
Hidróx. de Cobre	71 a	9 c	2 d	1 c	1 a	1 a	0 a
Azoxistrobina	71 a	39 b	17 c	10 b	6 a	6 a	0 a
Piraclostrobina	71 a	49 a	35 b	34 a	8 a	1 a	1 a
Picoxistrobina	71 a	55 a	45 a	14 b	8 a	6 a	0 a
IJC	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	50 a	43 b	34 b	9 c	1 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	50 a	48 a	5 c	1 d	0 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	50 a	35 c	4 c	1 d	1 a	0 a	0 a
Piraclostrobina	50 a	44 b	39 a	29 b	3 a	1 a	0 a
Picoxistrobina	50 a	46 a	35 b	35 a	4 a	1 a	0 a
ITU	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	46 a	48 a	37 b	33 b	3 b	1 a	0 a
Hidróx. de Cobre	46 a	51 a	47 a	47 a	21 a	7 a	1 a
Azoxistrobina	46 a	41 b	22 c	9 c	3 b	2 a	1 a
Piraclostrobina	46 a	41 b	35 b	30 b	8 b	2 a	0 a
Picoxistrobina	46 a	47 a	39 b	29 b	9 b	5 a	1 a
LAV	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	51 a	4 b	2 b	2 c	2 b	1 a	0 a
Hidróx. de Cobre	51 a	8 b	2 b	2 c	1 b	3 a	0 a
Azoxistrobina	51 a	46 a	20 a	27 a	31 a	1 a	1 a
Piraclostrobina	51 a	42 a	31 a	20 b	28 a	3 a	0 a
SER	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	51 a	47 b	33 c	1 c	0 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	51 a	56 a	3 d	1 c	0 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	51 a	47 b	5 d	0 c	0 a	0 a	0 a
Piraclostrobina	51 a	50 b	47 a	24 b	1 a	1 a	0 a
Picoxistrobina	51 a	48 b	41 b	33 a	3 a	0 a	0 a
OLH	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	57 a	60 a	58 a	24 b	2 a	1 a	1 a
Hidróx. de Cobre	57 a	55 b	4 d	1 c	0 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	57 a	43 c	8 d	3 c	2 a	1 a	0 a
Piraclostrobina	57 a	52 b	50 b	35 a	2 a	0 a	0 a
Picoxistrobina	57 a	51 b	43 c	38 a	3 a	2 a	0 a
OLI2	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	53 a	50 a	47 a	29 b	2 b	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	53 a	52 a	10 c	3 c	2 b	0 a	0 a
Azoxistrobina	53 a	47 a	33 c	8 c	3 b	1 a	0 a
Piraclostrobina	53 a	47 a	45 b	38 a	7 b	2 a	0 a
Picoxistrobina	53 a	44 a	42 b	40 a	16 a	5 a	0 a
SAA1	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	39 a	47 a	37 a	18 a	4 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	39 a	23 a	14 a	9 a	4 a	2 a	2 a
Azoxistrobina	39 a	27 a	24 a	21 a	16 a	8 a	2 a
Piraclostrobina	39 a	34 a	29 a	24 a	18 a	17 a	3 a
Picoxistrobina	39 a	34 a	23 a	26 a	25 a	15 a	3 a
SAA2	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	58 a	59 a	35 b	22 b	0 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	58 a	60 c	4 c	1 c	0 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	58 a	56 c	7 c	3 c	0 a	1 a	0 a
Piraclostrobina	58 a	56 b	43 a	41 a	0 a	0 a	0 a
Picoxistrobina	58 a	53 b	45 a	44 a	3 a	1 a	0 a
STG1	0	0,125	0,5	2	8	32	128

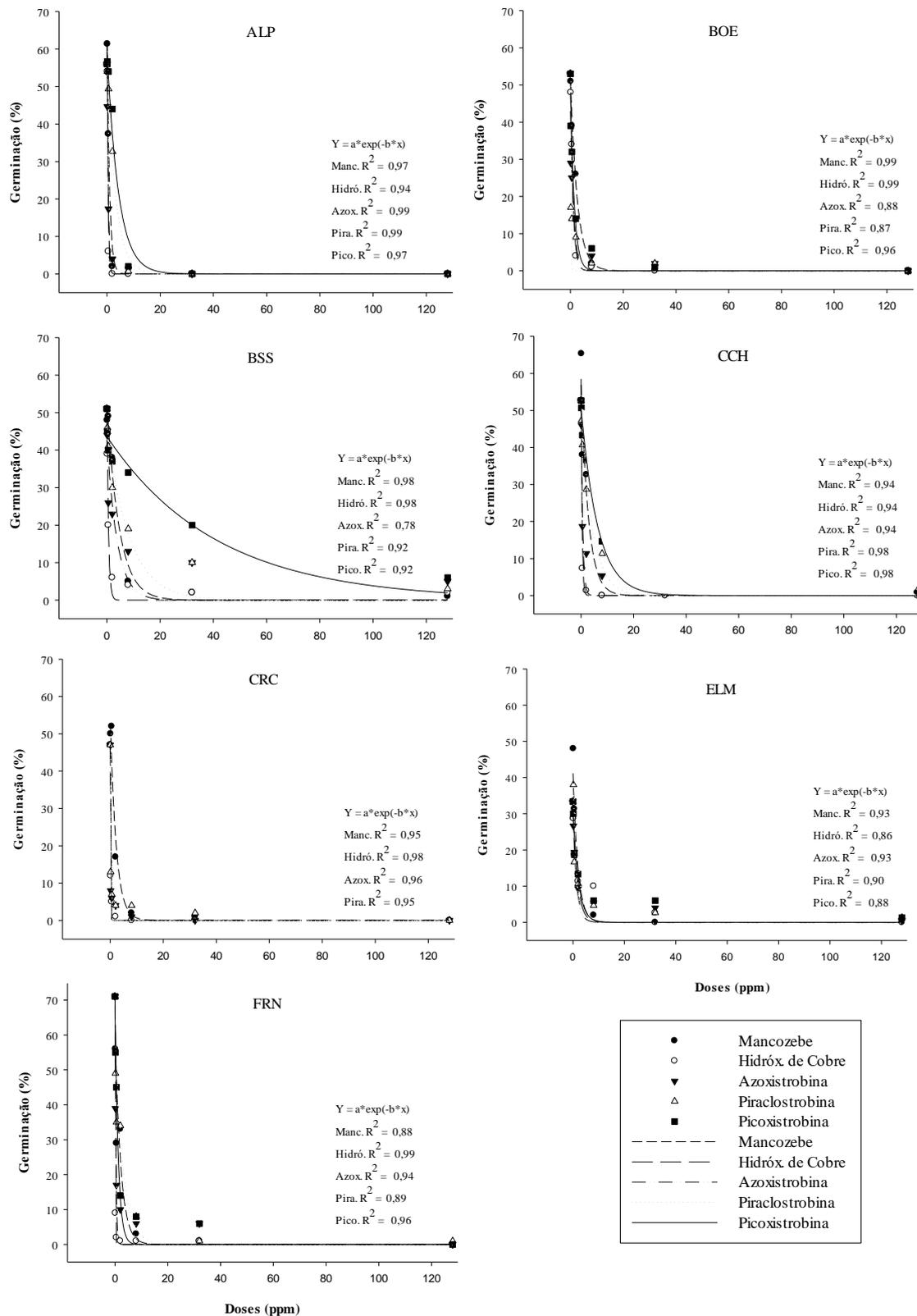
Mancozebe	65 a	41 c	32 b	16 b	2 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	65 a	59 a	7 c	2 c	1 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	65 a	47 b	5 c	2 c	1 a	0 a	0 a
Piraclostrobina	65 a	61 a	42 a	16 b	2 a	0 a	0 a
Picoxistrobina	65 a	57 a	41 a	39 a	2 a	1 a	0 a
STG2	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	64 a	54 a	37 b	33 a	4 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	64 a	44 b	8 c	1 b	0 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	64 a	45 b	8 c	3 b	2 a	1 a	0 a
Piraclostrobina	64 a	55 a	46 a	29 a	6 a	2 a	0 a
Picoxistrobina	64 a	53 a	47 a	34 a	4 a	3 a	0 a
TCO1	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	55 a	52 a	36 b	19 c	1 b	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	55 a	61 a	57 a	50 a	15 a	2 a	1 a
Azoxistrobina	55 a	39 b	19 c	4 d	3 b	2 a	0 a
Piraclostrobina	55 a	48 b	38 b	36 b	7 b	1 a	0 a
Picoxistrobina	55 a	43 b	34 b	23 c	4 b	2 a	1 a
TCO2	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	49 a	48 a	39 a	2 c	0 a	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	49 a	44 a	1 b	0 c	0 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	49 a	43 a	6 b	1 c	0 a	0 a	0 a
Piraclostrobina	49 a	43 a	40 a	24 b	4 a	1 a	0 a
Picoxistrobina	49 a	47 a	41 a	34 a	1 a	1 a	0 a
VGA1	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	32 a	29 a	23 a	2 a	2 a	1 a	0 a
Hidróx. de Cobre	32 a	6 b	2 b	1 a	1 a	0 a	0 a
Azoxistrobina	32 a	2 c	4 b	0 a	1 a	0 a	0 a
Piraclostrobina	32 a	3 c	2 b	2 a	1 a	1 a	0 a
VGA2	0	0,125	0,5	2	8	32	128
Mancozebe	57 a	51 a	46 a	29 b	3 c	0 a	0 a
Hidróx. de Cobre	57 a	53 a	49 a	43 a	5 c	1 a	1 a
Azoxistrobina	57 a	49 a	35 b	28 b	4 c	3 a	1 a
Piraclostrobina	57 a	47 a	43 a	40 a	25 b	3 a	2 a
Picoxistrobina	57 a	47 a	53 a	47 a	34 a	10 a	3 a

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si por meio do teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

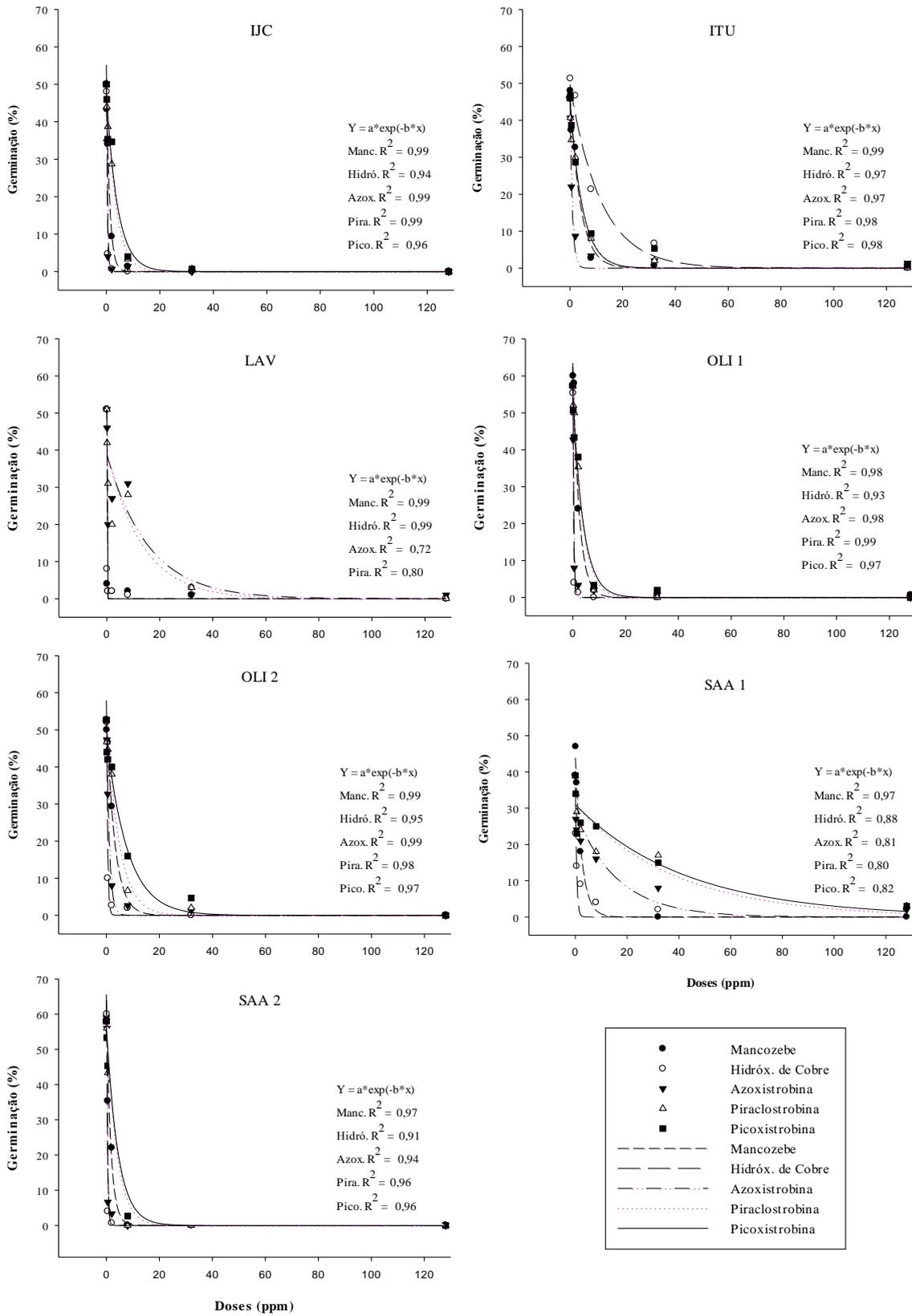
Os maiores valores de esporos germinados ocorreram sem adição de fungicidas, 0 ppm de ingrediente ativo (i.a), porém também houve variação entre os isolados, de 33 a 61% de germinação. Conforme houve o aumento das doses dos fungicidas ocorreu o decréscimo da porcentagem de germinação, sendo o modelo exponencial o de melhor ajuste da curva (Figura 1). Porém a sensibilidade aos fungicidas foi diferente entre os isolados. Para o ALP, proveniente de lavoura orgânica, a sensibilidade foi maior, não havendo germinação nas doses superiores a 8ppm e para o isolado SAA1, a sensibilidade foi menor com percentual de redução de 92% nos tratamentos com picoxistrobina e piraclostrobina na maior dose testada.

Na dose de 32ppm, no tratamento picoxistrobina os isolados SSA1, BSS, VGA2 e ELM foram os menos sensíveis e apresentaram os menores percentuais de redução da germinação, cerca de 61, 62, 82 e 83% respectivamente, os demais tratamentos reduziram acima de 85% a germinação dos esporos nesta concentração. Os dois isolados orgânicos foram os mais sensíveis com redução acima de 95%, em todos os tratamentos, a partir da concentração de 2 ppm. No geral, o isolado menos sensível foi o VGA2, este teve os menores percentuais de redução, sendo, para piraclostrobina, de 24, 30, 57, 95 e 97% nas concentrações de 0,5, 2, 8, 32 e 128ppm e 8, 19, 41, 83 e 95% para picoxistrobina nas concentrações de 0,5, 2, 8, 32 e 128ppm, respectivamente. Os tratamentos com hidróxido de cobre azoxistrobina inibiram acima de 50% a germinação dos esporos em quase todos os isolados já na terceira concentração, 0,5ppm (Figura 1).

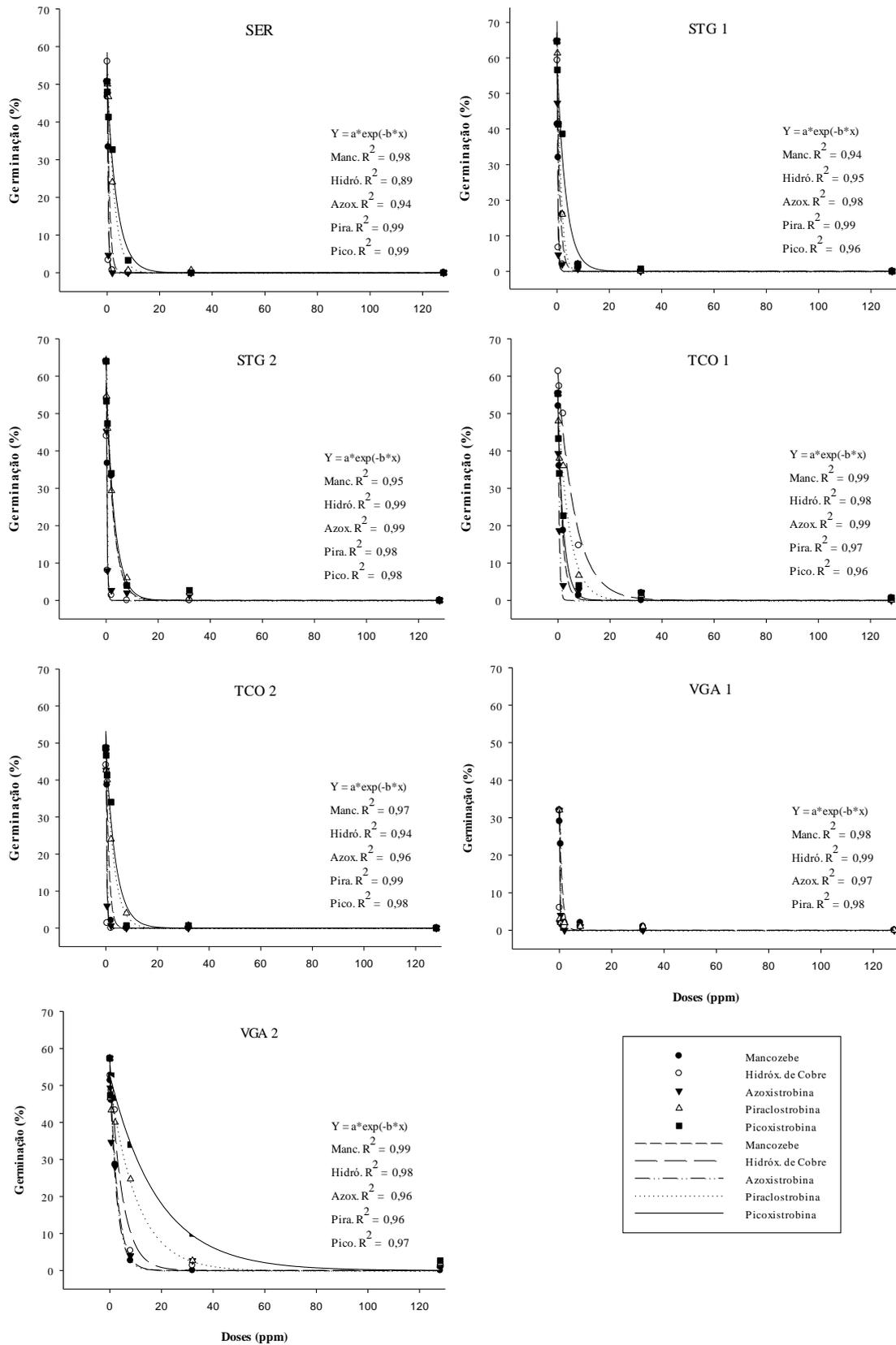
Figura 1 - Germinação dos uredósporos de *Hemileia vastatrix* nos diferentes isolados em função das concentrações dos fungicidas. UFLA, 2022.



Continua...



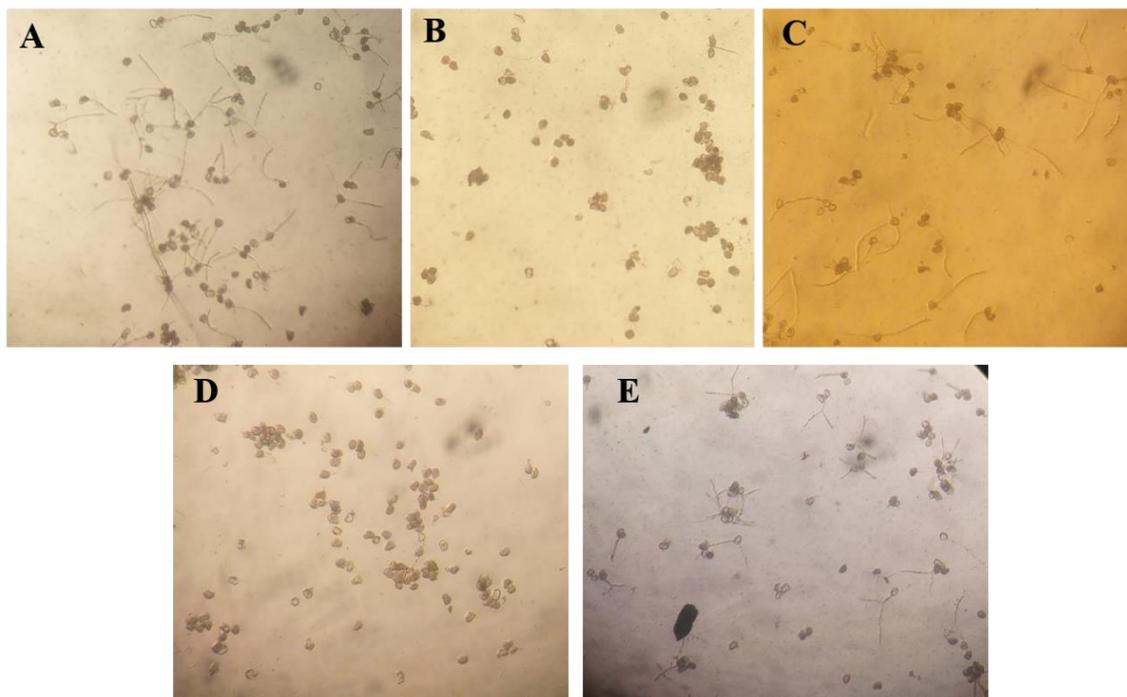
Continua...



Função = $a \cdot \exp(-b \cdot x)$

A partir da terceira concentração, 0,5 ppm de i.a., foi possível notar maior sensibilidade dos isolados nos tratamentos Azoxistrobina e Hidróxido de Cobre em relação aos demais tratamentos (Figura 2).

Figura 2 - Germinação dos esporos do isolado STG1 na concentração de 0,5 ppm de piraclostrobina (A), azoxistrobina (B), picoxistrobina (C), hidróxido de cobre (D) e mancozebe (E). UFLA, 2022.



3.1.1 Ec50 dos fungicidas

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os fungicidas e os 21 isolados testados para a Ec50. Houve diferença ($p < 0,05$) na sensibilidade dos isolados em relação ao Ec50.

Os fungicidas com os princípios ativos azoxistrobina, piraclostrobina e picoxistrobina apresentaram diferença na sensibilidade dos isolados ($p < 0,05$) destacando-se LAV e SAA1 com Ec50 de 3,22 e 9,38 ppm para piraclostrobina e BSS, SAA1 e VGA2 com Ec50 de 13,5, 10,42 e 8,83 ppm para picoxistrobina e LAV com Ec50 de 3,96 ppm para azoxistrobina. No geral, as maiores sensibilidades foram observadas nos tratamentos com hidróxido de cobre e azoxistrobina, com Ec50 de 0,6 a 6.

Considerando os valores da Ec50, houve diferença ($p < 0,05$) na sensibilidade em 5 isolados, sendo eles BSS, ITU, SAA1, TCO1 e VGA2 (Tabela 7).

Tabela 7 - EC50 (dose letal para inibir 50% da germinação) dos fungicidas nos isolados testados. UFLA, 2022.

	Mancozebe	Hidróx. De Cobre	Azoxistrobina	Piraclostrobina	Picoxistrobina
ALP	1,38 Aa	0,67 Aa	0,74 Aa	3,13 Aa	3,74 Aa
BOE	2,63 Aa	1,50 Aa	0,81 Aa	0,59 Aa	1,56 Aa
BSS	4,05 Aa	0,90 Aa	3,00 Aa	5,18 Aa	13,50 Bc
CCH	1,93 Aa	0,57 Aa	1,21 Aa	3,33 Aa	4,80 Aa
CRC	2,40 Aa	0,03 Aa	0,01 Aa	0,02 Aa	---
ELM	1,52 Aa	1,99 Aa	1,88 Aa	1,76 Aa	2,45 Aa
FRN	1,45 Aa	0,00 Aa	0,43 Aa	1,63 Aa	1,58 Aa
IJC	1,65 Aa	0,66 Aa	0,31 Aa	2,78 Aa	3,04 Aa
ITU	2,98 Aa	6,46 Ab	1,45 Aa	3,02 Aa	3,46 Aa
LAV	0,00 Aa	0,00 Aa	3,96 Ba	3,22 Ba	---
SER	1,41 Aa	0,59 Aa	0,61 Aa	3,01 Aa	3,21 Aa
OLI1	2,98 Aa	0,65 Aa	0,46 Aa	3,12 Aa	3,00 Aa
OLI2	3,12 Aa	0,89 Aa	1,54 Aa	3,66 Aa	4,33 Aa
SAA1	2,28 Aa	0,66 Aa	4,05 Aa	9,38 Ba	10,42 Bb
SAA2	1,88 Aa	0,63 Aa	0,75 Aa	3,10 Aa	3,37 Aa
STG1	0,92 Aa	0,63 Aa	0,35 Aa	1,87 Aa	2,40 Aa
STG2	2,12 Aa	0,36 Aa	0,40 Aa	2,39 Aa	2,50 Aa
TCO1	2,07 Aa	4,78 Ab	0,69 Aa	2,63 Aa	1,99 Aa
TCO2	1,47 Aa	0,50 Aa	0,57 Aa	2,87 Aa	3,24 Aa
VGA1	1,64 Aa	0,01 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	---
VGA2	2,47 Aa	3,48 Ab	2,20 Aa	4,48 Aa	8,83 Bb

--- Nos isolados CRC, LAV, e VGA1, não foi realizado o teste de germinação com o ativo picoxistrobina.

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

3.2 Controle da ferrugem em mudas de *Coffea arabica*

Nos ensaios realizados em mudas de café houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a testemunha e os demais tratamentos para área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e para a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), porém não houve diferença na sensibilidade dos isolados à fungicidas, sendo observada a presença da ferrugem predominantemente na testemunha.

O maior valor da AACPI (1.810) foi observado na testemunha do experimento com isolado TCO1. No ensaio com isolado VGA1 o tratamento com hidróxido de cobre teve o valor da AACPI de 995 intermediário entre a testemunha e os demais tratamentos. No ensaio com isolado LAV os tratamentos com mancozebe, hidróxido de cobre e testemunha não diferiram entre si e tiveram valores de AACPI de 139, 403 e 405, respectivamente. Os demais tratamentos não tiveram valores observados (Tabela 8), não havendo isolados sensíveis a estrobilurinas nas condições em que o experimento foi conduzido.

Tabela 8 - Área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) e eficiência no controle (E%) para ferrugem em mudas de cafeeiro. UFLA, 2020.

Tratamentos	Dose (ppm)	VGA1		LAV		CRC		VGA2		TCO1	
		AACPI	E(%)	AACPI	E(%)	AACPI	E(%)	AACPI	E(%)	AACPI	E(%)
Testemunha	0,0	1712 c	---	405,5 b	---	1183 b	---	419,5 b	---	1810,2 b	---
Mancozebe	2.250	0 a	100	139,1 ab	65,7	0 a	100	0 a	100	0 a	100
Hid. De Cobre	1.075	995,3 b	41,9	403,9 b	0,4	0 a	100	0 a	100	44,5 a	97,2
Azoxistrobina	125	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100	42,2 a	97,7
Piraclostrobina	437,5	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100
Pira. + Epox.	498,7 + 187,5	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100

Foi utilizada a dose comercial considerando 400 litros de calda por hectare.

*Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si por meio do teste Tukey a 5% de probabilidade.

O maior valor da AACPS (160,8) foi observado na testemunha do experimento com isolado VGA1 (161) que difere dos demais tratamentos com os diferentes fungicidas. Nos isolados LAV e VGA2 não foram observados valores significativos (Tabela 9).

Tabela 9 - Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) e eficiência no controle (E%) para ferrugem em mudas de cafeeiro. UFLA, 2020.

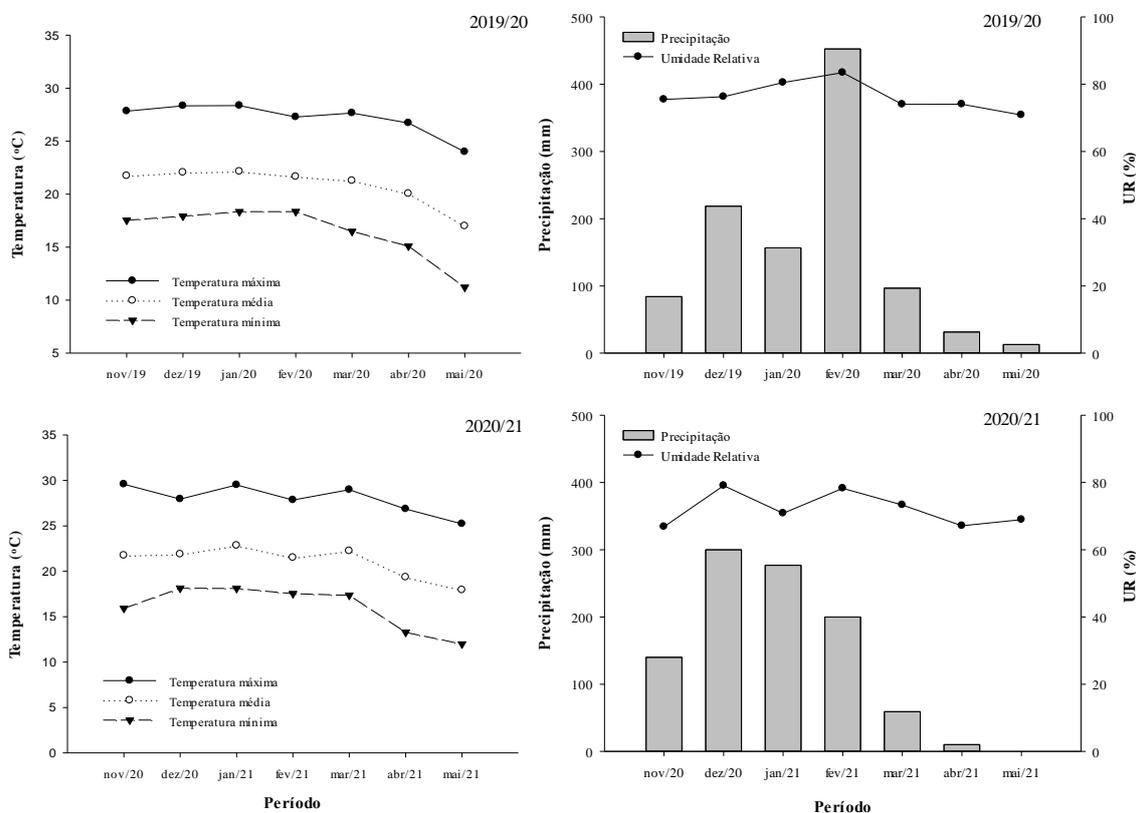
Tratamentos	VGA1		LAV		CRC		VGA2		TCO1	
	AACPS	E(%)	AACPS	E(%)	AACPS	E(%)	AACPS	E(%)	AACPS	E(%)
Testemunha	161 b	---	25,1 a	---	126 b	---	44,2 a	---	82,0 b	---
Mancozebe	0 a	100	7,7 a	69,3	0 a	100	0 a	100	0 a	100
Hid. De Cobre	28,7 a	82,2	34 a	0	0 a	100	0 a	100	0 a	100
Azoxistrobina	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100	54,4 a	34
Piraclostrobina	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100
Pira. + Epox.	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100	0 a	100

*Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si por meio do teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Controle da ferrugem em folhas de cafeeiro no campo.

As variáveis climáticas foram monitoradas durante os dois anos do experimento. No ano de 2019/20 a temperatura variou entre 11,0 e 28,0°C, com média em torno de 21,0 °C e a umidade relativa média aproximadamente 75,0%. No ano de 2020/21 a temperatura variou entre 12,0°C e 30,0°C, com média em torno de 21,0 °C e a umidade relativa média aproximadamente 70,0%. A maior precipitação pluviométrica foi observada em fevereiro de 2020 com 452 mm (Figura 5)

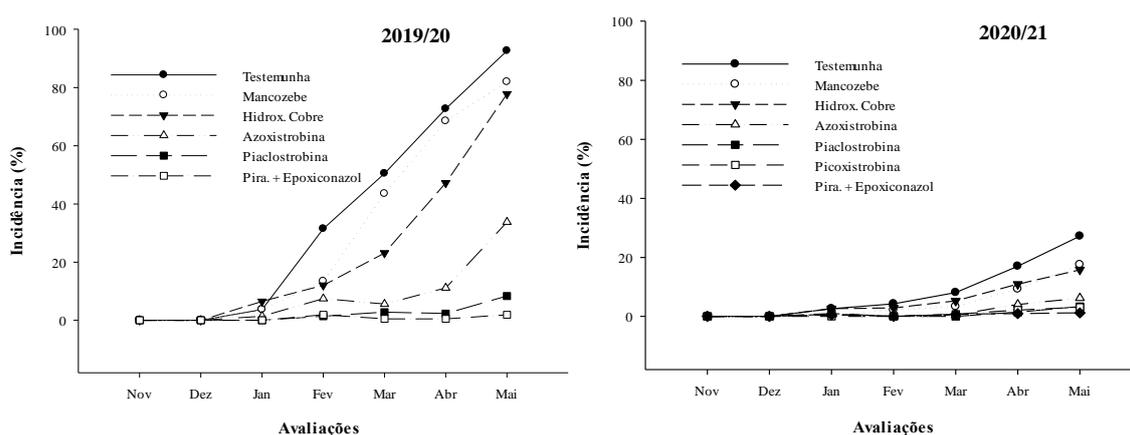
Figura 5 - Variáveis climáticas registradas no município de Varginha – MG durante a condução do experimento. Primeiro ano (2019/20), segundo ano (2020/21). Fonte: INMET (2021). UFLA, 2022.



Nos dois anos de condução do experimento não foi observada a incidência de ferrugem nos meses de novembro e dezembro. Nos meses seguintes o aumento da ferrugem foi constante em todos os tratamentos. A menor incidência foi observada no tratamento com fungicida piraclostrobina + epoxiconazol, este ficou abaixo de 2% de

incidência em maio 2020 e 2021. Nos dois anos, a maior incidência da ferrugem foi observada no tratamento testemunha, com valores de incidência de 92% no mês de maio do ano agrícola 2019/20 e 27% no mês de maio do ano agrícola 2020/21 (Figura 6). Dessa forma, não foi observado redução da eficiência dos fungicidas a base de estrobilurinas no controle da ferrugem do café no campo.

Figura 6 - Curva de progresso da incidência da Ferrugem (*Hemileia vastatrix*) nas diferentes datas de avaliações, em função dos fungicidas aplicados nos dois anos de condução. UFLA, 2022.

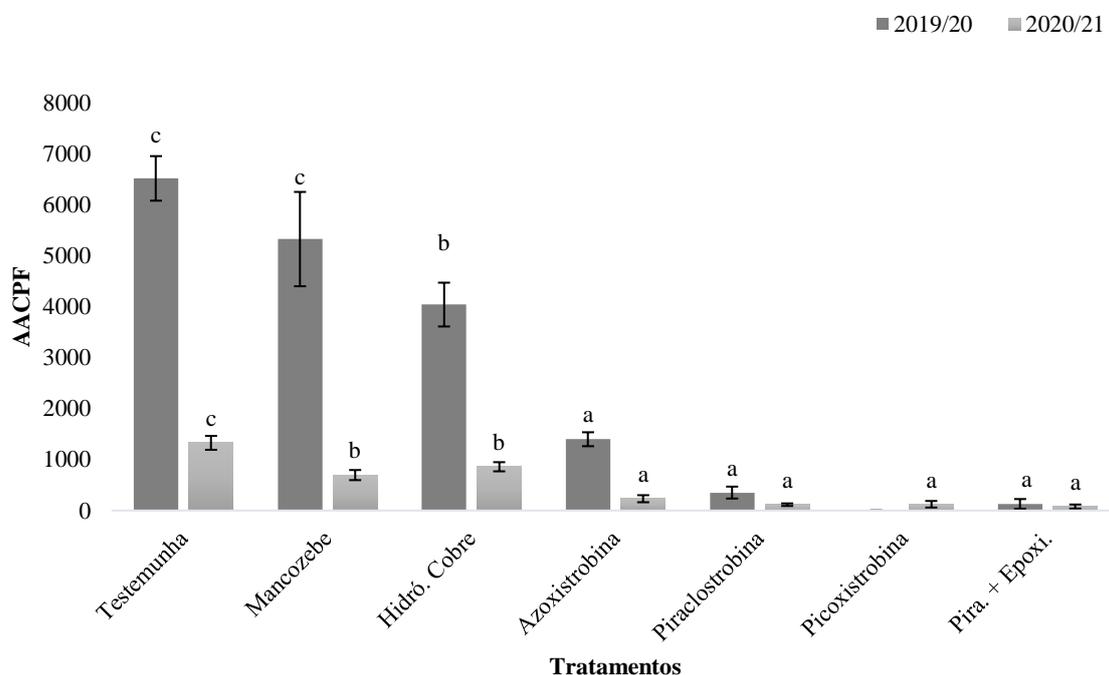


Houve interação significativa entre os experimentos repetidos no tempo para as variáveis analisadas ($p < 0,05$) (Anexo B). Portanto, realizou-se avaliação separando-se os dados dos dois anos de condução do experimento.

Os menores valores de AACPF foram observados no tratamento Fungicida, piraclostrobina + epoxiconazol e piraclostrobina com mais de 90% de controle da ferrugem nos dois anos de condução. Ou seja, nessa área, o fungo *Hemileia vastatrix* ainda foi sensível a esses fungicidas. Já os maiores valores foram observados nos tratamentos testemunha, mancozebe e hidróxido de cobre, respectivamente. No primeiro ano o tratamento mancozebe não diferiu estatisticamente da testemunha, tendo 18% de eficiência no controle. Já o tratamento hidróxido de cobre diferiu estatisticamente de todos os outros tratamentos com 38% de controle da ferrugem. Sendo os demais tratamentos, azoxistrobina, piraclostrobina e pira + epoxiconazol e não diferiram entre si e tiveram eficiência acima de 75%. No segundo ano, 2020/21, a testemunha obteve a maior AACPF e diferiu estatisticamente de todos os tratamentos. Os tratamentos mancozebe e hidróxido de cobre não diferiram entre si e tiveram eficiência de 47% e

35%, respectivamente, os demais tratamentos, azoxistrobina, piraclostrobina, picoxistrobina e pira + epóxi. não diferiram entre si e tiveram mais de 80% de eficiência no controle (Figura 7).

Figura 7 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem (AACPF) em função dos fungicidas aplicados nos dois anos de condução. UFLA, 2022.



Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os fungicidas nas diferentes datas de avaliação. O início do aparecimento dos sinais da ferrugem foi identificado nas avaliações do mês de janeiro. No primeiro ano em todas as avaliações a incidência da ferrugem na testemunha e nos tratamentos mancozebe e hidróx. de cobre foi superior aos demais tratamentos. No mês de maio houve variação na sensibilidade para os fungicidas azoxistrobina, este diferiu dos outros tratamentos com 63% de eficiência no controle, apresentando resultado intermediário, ficando abaixo dos tratamentos com piraclostrobina e pira. + epóxi. No segundo ano, os maiores valores de incidência, nas diferentes datas das avaliações também foram nos tratamentos testemunha, mancozebe e hidróx. de cobre. O fungo *Hemileia vastarix* é altamente sensível aos fungicidas com os princípios ativos a base de picoxistrobina e piraclostrobina, estes, juntamente com o fungicida de mistura, foram os mais eficientes no controle da ferrugem em todas as avaliações (Tabela 10).

No geral, a incidência da ferrugem no segundo ano de condução do experimento foi inferior ao primeiro ano de condução (Tabela 10).

Tabela 10 - Incidência da ferrugem do cafeeiro nas diferentes datas de avaliação e área abaixo da curva de progresso da ferrugem (AACPF) em função dos diferentes fungicidas nos 2 anos. UFLA 2022.

2019 / 2020																		
Tratamentos	Jan	E(%)	Fev	E(%)	Mar	E(%)	Abr	E(%)	Mai	E(%)	AACPF	E(%)						
Testemunha	3,7	a	---	31,5	b	---	50,5	c	---	72,7	c	---	92,6	d	---	6522	c	---
Mancozebe	3,7	a	0	13,4	a	57,4	43,5	c	13,8	68,5	c	5,7	81,9	c	11,5	5330	c	18,3
Hidró. Cobre	6,5	a	0	12	a	61,8	23,2	b	54,1	47,2	b	35	77,8	c	16	4044	b	38
Azoxistrobina	1,4	a	62,5	7,4	a	76,5	5,6	a	89	11,1	a	84,7	33,8	b	63,5	1400	a	78,5
Piraclostrobina	0	a	100	1,4	a	95,6	2,8	a	94,5	2,3	a	96,8	8,3	a	91	352,3	a	94,6
Pira. + Epoxi.	0	a	100	1,9	a	94,1	0,5	a	99,1	0,5	a	99,4	1,9	a	98	129,2	a	98

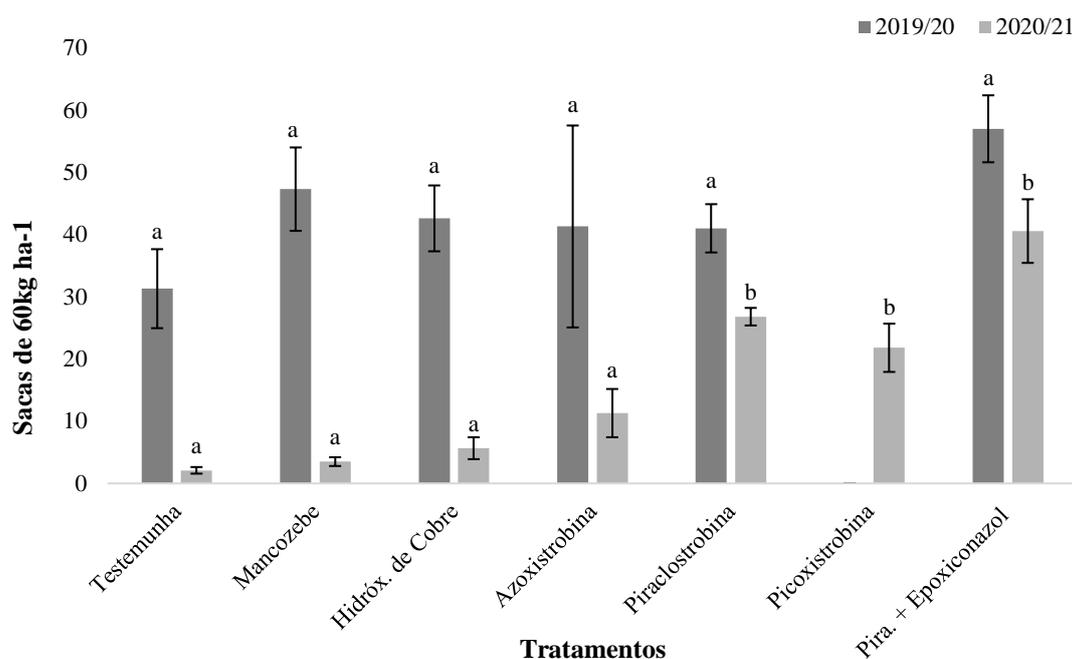
2020 / 2021																		
Tratamentos	Jan	E(%)	Fev	E(%)	Mar	E(%)	Abr	E(%)	Mai	E(%)	AACPF	E(%)						
Testemunha	2,6	a	---	4,3	c	---	8,0	c	---	17,0	c	---	27,2	c	---	1329,4	c	---
Mancozebe	0,5	a	81,8	2,1	b	50,0	3,3	a	58,8	9,2	b	45,8	17,5	b	35,7	696,2	b	47,6
Hidró. Cobre	2,6	a	0,0	2,8	b	33,3	5,2	b	35,3	10,9	b	36,1	15,9	b	41,7	859,6	b	35,3
Azoxistrobina	0,7	a	72,7	0,0	a	100,0	0,5	a	94,1	4,0	a	76,4	6,2	a	77,4	231,8	a	82,6
Piraclostrobina	0,9	a	63,6	0,0	a	100,0	0,0	a	100,0	1,4	a	91,7	3,3	a	87,8	114,8	a	91,4
Picoxistrobina	0,0	a	100,0	0,0	a	100,0	0,7	a	91,2	2,1	a	87,5	3,1	a	88,7	123,3	a	90,7
Pira. + Epoxi.	0,5	a	81,8	0,0	a	100,0	0,7	a	91,2	0,9	a	94,4	1,2	a	95,7	78,3	a	94,1

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si por meio do teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Houve interferência significativa na produtividade, quando aplicados de forma isolada por dois anos consecutivos.

No ano de 2019/20 o maior valor em sacas por hectare foi observado no tratamento piraclostrobina + epoxiconazol, com produtividade de 57 sacas. Já para o ano de 2020/21 os tratamentos com o fungicida em mistura (Pira.+epóxi.), piraclostrobina e picoxistrobina obtiveram maiores valores de produtividade com 40, 26 e 21 sacas respectivamente. Nos dois anos, a menor produtividade foi observada na testemunha, como 31 sacas no primeiro ano e 2 no segundo ano de condução do experimento (Figura 8).

Figura 8 - Produtividade da lavoura em função dos tratamentos aplicados nos dois anos de condução do experimento. UFLA, 2022



Não houve diferença estatística entre os tratamentos aplicados no primeiro ano do experimento. O maior valor de produtividade relativa foi obtido no tratamento piraclostrobina + epoxiconazol, com de 45%. Já para o segundo ano, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Os tratamentos com fungicida em mistura de piraclostrobina com epoxiconazol, piraclostrobina e picoxistrobina de forma isolada, obtiveram maiores valores de produtividade e diferiram dos demais tratamentos com produtividade relativa acima de 90%. Os tratamentos com menores produtividades em relação a testemunha foram o mancozebe, hidróxido de cobre e azoxistrobina com 40, 63 e 81% respectivamente. Se comparado os dois anos de condução a produtividade reduziu aproximadamente 93% na testemunha, 92% no tratamento com mancozebe, 86% no tratamento com hidróxido de cobre e 72% no tratamento com a estrobilurina azoxistrobina (Tabela 11). Portanto, a menor sensibilidade do patógeno a estes fungicidas interferiu de forma significativa na produtividade, quando aplicados de forma isolada por dois anos consecutivos.

Tabela 11: Média da Produtividade do cafeeiro em sacas de 60 kg/ha⁻¹ em função dos fungicidas aplicados na safra 2019/20 e 2020/2021. UFLA 2022.

Tratamentos	Produtividade sacas de 60 Kg ha ⁻¹			
	2019/2020	PR(%)	2020/2021	PR(%)
Testemunha	31,3 a		2,1 a	
Mancozebe	47,3 a	33,8	3,5 a	40,0
Hidróx. de Cobre	42,6 a	26,5	5,66 a	62,9
Azoxistrobina	41,3 a	24,2	11,3 a	81,4
Piraclostrobina	41,0 a	23,7	26,8 b	92,2
Picoxistrobina	21,8 b	90,4
Pira. + Epoxiconazol	57,0 a	45,1	40,56 b	94,8

PR(%) – Produtividade relativa;

*Médias seguidas por mesmas letras não diferem entre si por meio do teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Apesar dos fungicidas serem eficientes para inibir a germinação dos esporos, houve diferença na sensibilidade para estrobilurinas, para as doses avaliadas, entre os isolados utilizados na pesquisa. Os fungicidas do grupo das estrobilurinas atuam na respiração mitocondrial dos fungos e são conhecidos por ter efeito preventivo ou protetor, pois afetam diretamente a germinação de esporos, impedindo o início da fase de infecção do patógeno (GULART, 2009). De acordo com Anesiadis et al. (2003), as estrobilurinas agem na superfície da folha, inibindo os primeiros estádios do processo de infecção, como a germinação de esporos, penetração e estabelecimento inicial do patógeno. Sendo assim, a metodologia mais adequada para avaliar a sensibilidade de fungos a esses fungicidas, é o teste de germinação (GULART, 2009).

Nos ensaios realizados *in vitro* com a segunda maior dose, 32ppm, 50% dos isolados diferiram dos demais no tratamento com azoxistrobina variando de 1,3 a 10% de germinação e no tratamento com picoxistrobina 8 dos isolados obtiveram resultados diferentes dos demais, chegando a 20% de germinação. Essa variação entre os índices de germinação indica existência de diferença nos níveis de sensibilidade dos isolados, sendo uns mais sensíveis e outros menos pois, metade dos isolados teve germinação zero ou próximo de zero, entretanto, outros isolados tiveram germinação superiores a zero. A existência da diferença entre os níveis de sensibilidade dos isolados ficou mais clara quando aplicado a dose de 128ppm. Nesta dose a maioria dos isolados apresentaram

germinação zero, contudo, 3 dos 21 isolados destacaram dos demais variando de 2 a 6% de germinação nos tratamentos com estrobilurinas.

Na literatura não há registros de doses definidas para testes de sensibilidade com esporos de *Hemileia vastatrix*, entretanto, com os dados deste trabalho é possível definir as doses de 32 e 128 ppm de ingrediente ativo como dose resposta para identificar a existência da variação entre os níveis de sensibilidade dos isolados de *Hemileia vastatrix*. Porém, não é possível afirmar a presença de resistência em razão de a dose de 128ppm ser superior a dose registrada para o controle da ferrugem apenas para o fungicida a base de azoxistrobina.

Porém, o isolado VGA2 foi um dos 3 isolados com germinação expressiva na maior dose testada e deve ser considerado para estudos futuros sobre resistência de *H. vastatrix* a fungicidas no cafeeiro. O isolado VGA2 foi coletado em lavoura onde, no ano de 2020, o controle da doença não foi 100% eficaz, mesmo sendo aplicado fungicida de acordo com recomendação agronômica.

Nos dados da Ec50 foi observada redução expressiva na sensibilidade do patógeno *H. vastatrix* ao fungicida azoxistrobina (tabela 5) em relação aos isolados BSS, LAV, SSA1 e VGA2, com valores de Ec50 de 3; 3,96; 4,05 e 2,2 ppm, respectivamente. Em experimentos realizados anteriormente por Bragança no ano de 2010 com populações de *Hemileia vastatrix* de Minas Gerais e Espírito Santo, a concentração inibitória, Ec50, de azoxistrobina para prevenir a germinação de esporos foi entre 0,004 e 0,12 ppm, ou seja, inferior às encontradas no presente trabalho. Porém, mesmo com a diminuição da sensibilidade desses isolados, não é possível afirmar a resistência do patógeno a este princípio ativo, pois os valores da Ec50 ainda são baixos, menor que 10 ppm.

De acordo com Sharvelle (1961) a Ec50 corresponde à dose letal capaz de inibir 50% dos esporos viáveis de um fungo e é usado para descrever a potência de um fungicida. Para Hassal (1990) a Ec50 é o índice mais sensível de toxicidade sendo usualmente adotada como padrão de comparação da toxicidade de uma substância. Bampi et al. (2013) sugerem, para *Phakopsora pachyrhizi*, que substâncias com $Ec50 < 0,1$ ppm sejam consideradas altamente fungitóxicas; com Ec50 entre 0,1 e 20 ppm, fungitóxicas; Ec50 entre 21 e 100 ppm, moderadamente fungitóxica e $Ec50 > 100$ ppm, substância não tóxica.

Com relação aos critérios de Bampi et al (2013) citados acima, os 21 isolados testados neste trabalho são classificados como altamente sensíveis ou apenas sensíveis.

Contudo, os valores de Ec_{50} do fungicida com fungicida picoxistrobina encontrados para os isolados BSS (13,5ppm), SSA1 (10,4ppm) e VGA2 (8,8ppm) se destacaram por apresentarem valores superiores aos demais isolados, ou seja, há a necessidade de se utilizar doses maiores para inibir a germinação dos uredósporos destes isolados.

Os tratamentos com hidróxido de cobre e mancozebe se sobressaíram em relação aos fungicidas a base de estrobilurinas, diferente dos resultados obtidos quando estes tratamentos foram aplicados no campo. Quando realizados os ensaios *in vitro* toda a superfície dos uredósporos tem contato direto com as partículas dos fungicidas, aumentando assim as chances de o fungicida exercer sua função. Isso explica o fato de os tratamentos com hidróxido de cobre e mancozebe terem se sobressaído em relação aos fungicidas a base de estrobilurinas. Outra questão também explica a divergência entre os resultados *in vitro* e campo, de acordo com Azevedo (2003), no campo, diversos fatores podem interferir na qualidade de aplicação dos fungicidas não-sistêmicos, diminuindo a eficiência de controle das doenças. Tais como, a tecnologia de aplicação (densidade, diâmetro e uniformidade de distribuição de gotas), as condições do ambiente no momento da aplicação, o estágio fenológico da cultura e o nível populacional do patógeno.

Os fungicidas também foram aplicados no campo por dois anos, no qual houve diferença na intensidade da ferrugem de um ano para outro. No primeiro ano de condução a incidência na testemunha ultrapassou 90% e no segundo ano alcançou 30%. Resultados semelhantes foram encontrados por Cunha, Mendes e Chalfoun (2004). Estes autores observaram incidência acima de 80% no primeiro ano e 30% no mesmo período de avaliação do ano seguinte e atribuíram a diminuição da incidência da ferrugem de um ano para outro à redução da produção e as alterações do clima. Se observado os valores referentes ao clima nos dois anos, nota-se volume muito inferior de precipitação no mês de fevereiro do ano de 2021 em relação ao ano de 2020 e as temperaturas no período de 2019/2020 foram mais constantes se comparadas ao período de 2020/2021. Portanto, o clima teve papel importante na influência da queda da incidência da doença no segundo ano de condução do experimento.

Nos dois anos de condução os tratamentos com hidróxido de cobre e mancozebe tiveram os maiores valores de incidência, muito próximos aos encontrados na testemunha. Resultados semelhante foi obtido no trabalho desenvolvido por Vilela (2020) onde o uso do hidróxido de cobre isolado proporcionou redução no controle da ferrugem superior apenas a testemunha, sendo inferior aos demais tratamentos usados no trabalho, reduzindo 17% da doença. Vilela atribui a baixa eficiência do hidróxido de cobre aos

aspectos extrínsecos do produto, com ação exclusivamente protetora e também por possível lavagem dos ingredientes ativos, especialmente em cenários de chuvas frequentes, e a alta intensidade do ataque do patógeno. Com isso, fica clara a importância do uso de fungicidas sistêmicos, principalmente em épocas de alta probabilidade de chuvas.

Todas as estrobilurinas foram eficientes no controle da ferrugem em condições de campo. De acordo com os valores médios da área abaixo da curva de progresso da doença, AACPD, os tratamentos piraclostrobina, picoxistrobina e opera (triazol + estrobilurina) tiveram eficiência acima dos 90%. A menor eficiência entre as estrobilurinas, foi da azoxistrobina, próximo de 85%. No trabalho desenvolvido por Vilela (2020) o tratamento com azoxistrobina pura proporcionou a redução de 81% da incidência da ferrugem, resultado semelhante aos obtidos no presente trabalho. Vilela testou também o uso de azoxistrobina combinado com triazol e os resultados mostraram acréscimo de 6% na eficiência.

Com relação a produtividade, no primeiro ano de condução do experimento não houve diferença entre os tratamentos, isso já é esperado devido a bienalidade do cafeeiro e início dos tratamentos refletindo no segundo ano. Já no segundo ano a diferença na produtividade foi alta, tendo redução da produtividade acima de 90% na testemunha, fato que pode explicar a redução da incidência da ferrugem no segundo ano de condução do experimento. A alta incidência da ferrugem acentua o ciclo bienal do cafeeiro devido a redução da área fotossintética da planta e quanto maior a produção da lavoura maior a incidência da ferrugem (PATRICIO e OLIVEIRA, 2014, POZZA et al, 2021). O tratamento azoxistrobina não foi eficiente com relação a produtividade, este tratamento diferiu dos demais fungicidas a base estrobilurina com produtividade relativa de 81%, enquanto as demais estrobilurinas conseguiram alcançar produtividade relativa acima de 90%. A diferença de produtividade do tratamento azoxistrobina em relação as outras estrobilurinas pode ser atribuída ao fato deste tratamento ter obtido menor controle da incidência da ferrugem.

De acordo com os dados de produtividade, a azoxistrobina, assim como os protetores, devem estar associados a outro princípio ativo, a fim de alcançar resultados satisfatórios. Resultados de produtividade são importantes pois, tem consequência direta nos aspectos econômicos da cultura, tornando inviável a atividade. Sabendo disso, os fungicidas com mistura de princípios ativos são opção relevante para o manejo da doença, inclusive com os protetores multissítios. Fungicidas com mais de um princípio ativo

garantem eficiência no controle da ferrugem com conseqüente maior produtividade, como observado nos experimentos deste trabalho e também por Vilela em 2020, além de reduzirem o risco de ocorrer seleção de indivíduos resistentes.

Nos experimentos realizados em casa de vegetação não foi observado dados relevantes com relação a sensibilidade dos isolados. Os sinais do patógeno foram identificados apenas nas testemunhas. Em vista disso, sob condições de casa de vegetação os fungicidas são 100% eficazes no controle da ferrugem. Para maiores resultados em casa de vegetação, é interessante a execução de outros experimentos com metodologia diferente da utilizada no presente trabalho, como a redução da concentração da suspensão de esporos de 10^5 para 10^4 .

Apesar dos fungicidas ainda estarem controlando a ferrugem do cafeeiro, a presença de indivíduos resistentes não pode ser totalmente descartada. Levando em consideração os resultados dos testes de germinação, a informação sobre o controle da ferrugem na lavoura na qual foi retirada um dos isolados com menor sensibilidade em relação aos demais e a baixa eficiência na produtividade do ativo azoxistrobina, fica a necessidade de se realizar mais testes, como os moleculares, para elucidar a hipótese da possível existência da resistência de *Hemileia vastatrix* à estrobilurinas. A ideia do surgimento de resistência de *Hemileia vastatrix* é reforçada com os trabalhos desenvolvidos por Schmitz et al. (2014); Klosowski et al. (2016) e Simões et al. (2017). Esses autores relataram a resistência à estrobilurinas no patógeno *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem da soja. De acordo com Gisi et al (2000), a resistência a QoI está principalmente relacionada a mutações no gene do citocromo b (CYTB). O trabalho desenvolvido por Klosowski et al. (2016) mostra a existência da mutação F129L associada à resistência a QoI, para o fungo *Phakopsora pachyrhizi*.

Considerando as características populacionais, a alta variabilidade genética nas populações de *H. Vastatrix* afeta a evolução da resistência a estrobilurinas (NUNES et al., 2009). Do ponto de vista genético-evolutivo, fatores relativos a *H. Vastatrix* como o tamanho da população, recombinação, migração e seleção imposta através do uso inadequado de fungicidas podem afetar o risco de surgimento de mutantes (GISI et al., 2002). O patógeno tem alta taxa de multiplicação e grande quantidade de esporos é produzida durante o ciclo da doença, isso contribui para aumentar as chances de gerar indivíduos resistentes.

O monitoramento da sensibilidade dos patógenos alvos, especialmente quando realizados para os fungicidas potencialmente vulneráveis, em termos de pressão seletiva

e resistência, poderá contribuir para ações e decisões técnicas mais assertivas. Sendo assim, torna-se necessário o monitoramento constante de diferentes populações tanto *in vitro*, quanto em diferentes áreas nos campos de cultivo das principais regiões produtoras.

5 CONCLUSÕES

As populações de *Hemileia vastatrix* testadas são sensíveis às estrobilurinas azoxistrobina, piraclostrobina e picoxistrobina.

A dose de 128 ppm ou mg/Kg de ia. pode ser usada como dose resposta para testes de sensibilidade de *Hemileia vastatrix* à estrobilurinas.

Há diferença nos níveis de sensibilidade à estrobilurinas entre isolados de *Hemileia vastatrix*.

Na avaliação da doença, tanto em casa de vegetação quanto no campo, não foram observadas diferenças entre as estrobilurinas avaliadas. No segundo ano avaliado, no campo, a picoxistrobina, a piraclostrobina e a mistura dessa última com epoxiconazole obtiveram maiores produtividades, em relação aos demais tratamentos.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v.18, p.265-267, 1925.

ANESIADIS, T.; KAROAGLANIDIS, G. S.; TZAVELLA-KLONARI, K. Protective, curative and eradicant activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. **Journal of Phytopathology** 151: 647-651. 2003.

BAMPI, D. et al. Sensibility of *Stenocarpella macrospora* to fungicide. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 4, p. 787-795, 2013.

BARBOSA JR, M. P. et al. Irrigação por gotejamento e manejo do fósforo no progresso da ferrugem do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 39-48, 2017.

BRAGANÇA, C.A.D. **Sensibilidade de isolados de *Hemileia vastatrix* a azoxistrobina e tebuconazol**. Viçosa MG. 2010.

BRENT, K; HOLLOMON, D.H. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management**. FRAC Monograph V. 2. CropLife International, Brussels, 56 pp. 2007.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley. 532p. 1990.

CRUZ, F.J.; CHAVES, G.M. Efeito da adubação N, P, K e micronutrientes (F.T.E) na incidência da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). In: Congresso brasileiro de pragas e doenças do cafeeiro, Vitória, 1973. Resumos, Rio de Janeiro, IBC-GERCA, 60 p.1973.

CUNHA, R. L.; MENDES, A. N. G.; CHALFOUN, S. M. Controle químico da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. **Ciência e Agrotecnologia**. 28 (5). Out 2004.
<https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000500004>.

CUNHA, R.L.; POZZA, E. A.; DIAS, W. P.; BARRETTI, P. B. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da Ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. Resumos. Vitória: Embrapa Café. p. 77-78. 2001.

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

FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista brasileira de biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019.

FRAC-BR (Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas). Recomendações para a cultura do Café. Disponível em: < <https://www.frac-br.org/cafes>>. Acesso em mai de 2021.

GISI, U. et al. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, MI and strobilurin fungicides. **Crop protection** 19: 863-872. 2000.

GISI U.; SIEROTZKI H.; COOK A.; MCCAFFERY A. Mechanisms influencing the Evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, 58: 859-867. 2002.

GULART, C. A. Sensibilidade in vitro e in vivo de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (sacc & magn.) Briosi & cav., a fungicidas sistêmicos. Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2009.

HASSAL, K. A. **The Biochemistry and Uses of Pesticides** – Structure, Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection. Ed. 2. New York: VCH Publishers, 536 p. 1990.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Indicadores IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/indicadores.html>>. Acesso em mai de 2021.

KLOSOWSKI, A.C.; BRAHM, L.; STAMMLER, G. Competitive Fitness of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates With Mutations in the CYP51 and CYTB Genes. **Phytopathology**. 106: 1278-1284. doi: 10.1094/PHYTO-01-16-0008-R. 2016.

- KUSHALAPPA, A. C.; ESKES, A. B. Advances in coffee rust research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 503-531, Sept. 1989.
- MARCOLINO, E. **Determinação do intervalo da aplicação de produtos cúpricos a inoculação de *Hemileia vastatrix* em mudas de cafeeiro**. 50 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2019.
- MEIRA, C.A.A., RODRIGUES, L.H.A.; MORAIS, S.A. Análise da epidemia da ferrugem do 613 cafeeiro clehnom árvore de decisão. **Trop. Plant Pathol.** 33, 114-124. 614 <https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000200005>. 2009.
- NUNES, C.C.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; SILVA, J.C. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. Austral **Plant Pathol** 38:445-452. 2009.
- POZZA, E. A. Diagnose e controle de doenças. *In*: CARVALHO, G. R.; et al. **Cafeicultura do Cerrado**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2021, p. 347.
- POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L. CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. *In*: Guimaraes, R. J.; Mendes, A. N. G.; Baliza, D.P. **Semiologia do cafeeiro: Sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 215 p. 2010.
- RAYNER, R. W. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.). **Annals of Applied Biology**, v. 49, p. 497–505, 1961.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <<https://www.R-project.org/>>.
- SALCEDO-SARMIENTO et al. Elucidating the interactions between the rust *Hemileia vastatrix* and a Calonectria mycoparasite and the coffee plant. **iScience** 24, 102352 April 23, 2021.
- SANTOS, L.A.; SOUZA, P.E.; POZZA, E.A. Resistência de *cercospora coffeicola* a fungicidas. Lavras: UFLA, 70 p., 2015.
- SCHMITZ, H.K; MEDEIROS, C.A; CRAIG, I.R; STAMMLER, G. Sensivity of *Phakopsora pachyrhizi* toeards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and correponding resistance mechanisms. **Pest Manage. Sci.** 70:378-388. 2014.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slowmildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology, Saint Paul**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, ago. 1977.
- SHARVELLE, E. G. **The Nature and Uses of Modern Fungicides**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 308 p. 1961.

SIMÕES, K.; HAWLIK A.; REHFUS A.; GAVA F.; STAMMLER G. First detection of a SDH variant with reduce SDHI sensivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *J. Plant Dis. Prot.* doi: 10.1007/s41348-017-0117-5. 2017.

VARGAS, M.H. **ED50plus v1.0**. Cidade do Mexico: Instituto Nacional de Enfermidades Respiratórias, 2000.

VILELA, X. M. S. Fungicidas sistêmicos para ferrugem do cafeeiro: controle e eficiência na mistura com cúpricos e fertilizantes foliares. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2020.

ANEXO A

Tabela 1 - Quantidades das soluções estoque e suspensão de esporos pipetadas nos poços das placas. UFLA, 2022.

Fungicida	Concentração i.a (ppm)	Estoque (ul)		Esporos (ul)
Amistar	0,125	0,8	1	299,3
	0,5	3,0	1	297,0
	2	1,2	2	298,8
	8	4,8	2	295,2
	32	19,2	2	280,8
	128	76,8	2	223,2
Comet	0,125	0,6	1	299,4
	0,5	0,6	2	299,4
	2	2,4	2	297,6
	8	9,6	2	290,4
	32	38,4	2	261,6
	128	153,6	2	146,4
Oranis	0,125	0,6	1	299,4
	0,5	0,6	2	299,4
	2	2,4	2	297,6
	8	9,6	2	290,4
	32	38,4	2	261,6
	128	153,6	2	146,4
Manzate	0,125	0,50	1	299,50
	0,5	2,00	1	298,00
	2	0,800	2	299,20
	8	3,200	2	296,80
	32	12,800	2	287,20
	128	51,200	2	248,80
Supera	0,125	0,43	1	299,57
	0,5	1,71	1	298,29
	2	6,86	1	293,14
	8	27,43	1	272,57
	32	109,71	1	190,29
	128	73,14	2	226,86

Fungicida	Solução Estoque	
	1	2
Amistar	0,1 g/l	1g/l
Comet	0,25ml/l	1ml/l
Oranis	0,25ml/l	1ml/l
Manzate	0,1 g/l	1g/l
Supera	0,25ml/l	1ml/l

ANEXO B

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para a interação das variáveis fungicidas em relação ao ano de condução do experimento em campo. UFLA, 2022.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	5	76219225.682081	15243845.136416	68.193	0.0000
ANO	1	52323835.702136	52323835.702136	234.069	0.0000
TRATAMENTO*ANO	5	37673007.193414	7534601.438683	33.706	0.0000
erro	24	5364956.804467	223539.866853		
CV (%) =	26.91				

Tabela 2 - Resumo da análise de variância do experimento em campo no ano 2019/20. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	5	110179148.122600	22035829.624520	52.184	0.0000
BLOCOS	2	974676.316133	487338.158067	1.154	0.3540
erro	10	4222726.906667	422272.690667		
CV (%) =	21.93				

Tabela 3 - Resumo da análise de variância do experimento em campo no ano 2020/21. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	6	4184947.666040	697491.277673	64.033	0.0000
BLOCOS	2	52719.870217	26359.935108	2.420	0.1309
erro	12	130712.961967	10892.746831		
CV (%) =	21.28				

Tabela 4 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado ALP. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	3056.609524	764.152381	115.282	0.0000
DOSES	6	56203.580952	9367.263492	1413.165	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	7467.657143	311.152381	46.941	0.0000
erro	70	464.000000	6.628571		
CV (%) =	11.25				

Tabela 5 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado BOE. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
z					
CV (%) =	12.64				

Tabela 7 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado CCH. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	2537.752381	634.438095	62.845	0.0000
DOSES	6	45086.323810	7514.387302	744.350	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	4510.247619	187.926984	18.615	0.0000
erro	70	706.666667	10.095238		
CV (%) =	13.42				

Tabela 8 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado CRC. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	3	3230.892857	1076.964286	96.961	0.0000
DOSES	6	20672.142857	3445.357143	310.193	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	18	5493.857143	305.214286	27.479	0.0000
erro	56	622.000000	11.107143		
CV (%) =	24.75				

Tabela 9 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado ELM. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	206.704762	51.676190	3.111	0.0205
DOSES	6	17751.923810	2958.653968	178.130	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	1338.361905	55.765079	3.357	0.0000
erro	70	1162.666667	16.609524		
CV (%) =	26.03				

Tabela 10 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado FRN. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	4179.428571	1044.857143	27.109	0.0000
DOSES	6	58684.114286	9780.685714	253.761	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	6432.171429	268.007143	6.953	0.0000
erro	70	2698.000000	38.542857		
CV (%) =	26.34				

Tabela 11 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado IJC. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	2211.276190	552.819048	146.581	0.0000
DOSES	6	38759.161905	6459.860317	1712.842	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	4829.790476	201.241270	53.359	0.0000
erro	70	264.000000	3.771429		
CV (%) =	10.18				

Tabela 12 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado ITU. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	1996.723810	499.180952	23.441	0.0000
DOSES	6	34778.590476	5796.431746	272.194	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	2205.409524	91.892063	4.315	0.0000
erro	70	1490.666667	21.295238		
CV (%) =	19.06				

Tabela 13 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado LAV. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	3	5334.321429	1778.107143	105.258	0.0000
DOSES	6	21074.571429	3512.428571	207.924	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	18	4725.428571	262.523810	15.541	0.0000
erro	56	946.000000	16.892857		
CV (%) =	23.93				

Tabela 14 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado OLI1. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	3476.342857	869.085714	145.309	0.0000
DOSES	6	53902.400000	8983.733333	1502.057	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	8101.790476	337.574603	56.442	0.0000
erro	70	418.666667	5.980952		
CV (%) =	10.36				

Tabela 15 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado OLI2. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	1955.657143	488.914286	28.457	0.0000
DOSES	6	43946.895238	7324.482540	426.314	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	4932.342857	205.514286	11.962	0.0000
erro	70	1202.666667	17.180952		
CV (%) =	17.38				

Tabela 16 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado SER. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	2007.238095	501.809524	52.272	0.0000
DOSES	6	46269.790476	7711.631746	803.295	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	6159.161905	256.631746	26.732	0.0000
erro	70	672.000000	9.600000		
CV (%) =	15.64				

Tabela 17 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado SAA1. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	1474.628571	368.657143	23.291	0.0000
DOSES	6	15920.228571	2653.371429	167.632	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	2637.771429	109.907143	6.944	0.0000
erro	70	1108.000000	15.828571		
CV (%) =	19.78				

Tabela 18 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado SAA2. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	2642.895238	660.723810	120.444	0.0000
DOSES	6	59112.380952	9852.063492	1795.949	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	7292.571429	303.857143	55.391	0.0000
erro	70	384.000000	5.485714		
CV (%) =	9.94				

Tabela 19 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado STG1. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	2139.657143	534.914286	66.233	0.0000
DOSES	6	63510.095238	10585.015873	1310.645	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	5502.476190	229.269841	28.388	0.0000
erro	70	565.333333	8.076190		
CV (%) =	12.45				

Tabela 20 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado STG2. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	3294.857143	823.714286	27.028	0.0000
DOSES	6	57906.133333	9651.022222	316.674	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	5129.676190	213.736508	7.013	0.0000
erro	70	2133.333333	30.476190		
CV (%) =	23.00				

Tabela 21 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado TCO1. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	3266.057143	816.514286	24.952	0.0000
DOSES	6	47385.447619	7897.574603	241.340	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	3898.742857	162.447619	4.964	0.0000
erro	70	2290.666667	32.723810		
CV (%) =	22.91				

Tabela 22 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado TCO2. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	2148.038095	537.009524	61.024	0.0000
DOSES	6	40094.780952	6682.463492	759.371	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	5757.028571	239.876190	27.259	0.0000
erro	70	616.000000	8.800000		
CV (%) =	15.70				

Tabela 23 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado VGA1. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	3	752.892857	250.964286	56.216	0.0000
DOSES	6	9479.142857	1579.857143	353.888	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	18	1668.857143	92.714286	20.768	0.0000
erro	56	250.000000	4.464286		
CV (%) =	28.40				

Tabela 24 - Resumo da análise de variância do experimento *in vitro* com isolado VGA2. UFLA, 2021.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FUNGICIDAS	4	1441.295238	360.323810	13.551	0.0000
DOSES	6	47977.447619	7996.241270	300.718	0.0000
FUNGICIDAS*DOSES	24	2710.171429	112.923810	4.247	0.0000
erro	70	1861.333333	26.590476		
CV (%) =	17.37				