

LUCAS FAGUNDES DA SILVA

**POTENCIAL DE CONTROLE DAS FERRUGENS DO
CAFEEIRO E ASIÁTICA DA SOJA COM NOVAS MOLÉCULAS
DO GRUPO DE FUNGICIDAS DITIOCARBIMATOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586d
2018
Silva, Lucas Fagundes da, 1990-
Ditiocarbimatos : potencial do novo grupo químico para
controlada ferrugem-do-cafeeiro e da ferrugem-asiática-da-soja / Lucas
Fagundes da Silva. - Viçosa, MG, 2018.
x, 41 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ditiocarbimato (Fungicida). 2. Ferrugem-do-cafeeiro. 3.
Ferrugem asiática. 4. Café - Doenças e pragas. 5. Soja - Doenças e
pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.952

LUCAS FAGUNDES DA SILVA

**POTENCIAL DE CONTROLE DAS FERRUGENS DO
CAFEIEIRO E ASIÁTICA DA SOJA COM NOVAS MOLÉCULAS
DO GRUPO DE FUNGICIDAS DITIOCARBIMATOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

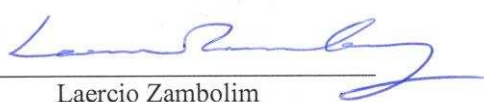
APROVADA: 28 de fevereiro de 2018.



Jorge Luis Babel Pacheco



Mayura Marques Magalhães Rubinger



Laercio Zambolim
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha vida e por estar ao meu lado em todos' os momentos.

À minha mãe, por me apoiar em todos os momentos, por acreditar que eu tinha a capacidade de estudar na UFV, pelos ensinamentos, pelo carinho e por ser a referência da minha vida. Te amo.

Ao meu pai, pelos ensinamentos e orientações ao longo da vida.

Aos meus familiares, pelos exemplos de honestidade, simplicidade e companheirismo.

Aos meus irmãos Matheus e Jonathan, pelo companheirismo e amizade.

À Universidade Federal de Viçosa pelo alto nível de formação.

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

À minha namorada Jaqueline Reis, pelo companheirismo, motivação e por me apoiar em todas as horas.

Ao Professor Laércio Zambolim, pela orientação, paciência, oportunidades, confiança e por ser uma referência profissional na minha carreira.

Ao Professor Jorge Badel, pela orientação, confiança e amizade.

Ao Antônio Vidigal pela amizade, orientação, confiança e pelos momentos de descontração durante o curso.

À Professora Mayura Rubinger pela orientação, concessão do laboratório e pela confiança.

Aos alunos da Química Nathália, Anderson, Rodrigo e Gabriel pelo convívio agradável no laboratório.

Aos alunos da Química Arthur e Marcelo, pela ajuda na síntese das moléculas e pelo convívio agradável.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da UFV que proporcionam um conteúdo de alto nível para os alunos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

Ao professor Fabrício Ávila, pelos conselhos e orientações.

Ao amigo Sérgio Milagres, que nunca mediu esforços para me ajudar.

Aos funcionários Camilo, Bruno, José Cláudio e Valtinho pela amizade e ajuda nos trabalhos.

Ao amigo Franklin pelos conselhos em estatística.

Ao Sr. Geraldo, pelo zelo e cuidado na condução das plantas de café e soja.

Ao Sr. Mário, pelo cuidado das plantas no viveiro de café e por ser um exemplo de simplicidade aos estudantes.

Aos companheiros do Laboratório de Proteção de Plantas, em especial, Manuel, Eduardo, Elaine, Douglas, Yanira, Ana, Rafael, Isadora, Poliana, Danilo e Roxana pelo convívio agradável.

Aos amigos Ernesto e Samuel, pela parceria nos trabalhos da pós-graduação e pelo convívio agradável proporcionado.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização do trabalho e para o meu desenvolvimento profissional.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

LUCAS FAGUNDES DA SILVA, filho de Lucimar Auxiliadora Fagundes e Osvaldo Viana da Silva, nasceu em Viçosa-MG, em 06 de setembro de 1990.

Em agosto de 2007 iniciou o curso Técnico em Meio Ambiente na Escola Técnica de Viçosa e concluiu em outubro de 2009.

Em março de 2011 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa e colou grau em 26 de janeiro de 2016.

No período de agosto de 2013 a julho de 2015 foi bolsista de iniciação científica do CNPq no laboratório de Proteção de Plantas – DFP/UFV.

Em março de 2016 ingressou no curso *stricto sensu* de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e submeteu-se a defesa da dissertação em 28 de fevereiro de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS	05

CAPÍTULO I

CONTROLE DA FERRUGEM-DO-CAFEIEIRO COM MOLÉCULAS DO GRUPO DITIOCARBIMATO EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

1. INTRODUÇÃO	08
2. MATERIAL E MÉTODOS	09
2.1 Síntese e caracterização dos ditiocarbimatos	09
2.2 Sensibilidade de <i>Hemileia vastatrix</i> aos ditiocarbimatos	11
2.3 Produção de uredosporos de <i>Hemileia vastatrix</i> e condução das mudas	11
2.4 Efeito dos ditiocarbimatos nos componentes epidemiológicos da ferrugem-do-cafeieiro	12
2.5 Análise estatística	13
3. RESULTADOS	14
3.1 Síntese dos ditiocarbimatos	14
3.2 Sensibilidade de <i>Hemileia vastatrix</i> aos ditiocarbimatos	15
3.3 Efeito dos ditiocarbimatos sobre as variáveis epidemiológicas da ferrugem-do-cafeieiro	18
4. DISCUSSÃO	22
4.1 Sensibilidade de <i>Hemileia vastatrix</i> aos ditiocarbimatos	22
4.2 Efeito dos ditiocarbimatos sobre as variáveis epidemiológicas da ferrugem-do-cafeieiro	23
5. CONCLUSÃO	25
6. REFERÊNCIAS	25

CAPÍTULO II

CONTROLE DA FERRUGEM-ASIÁTICA-DA-SOJA COM MOLÉCULAS DO GRUPO DITIOCARBIMATO EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Sensibilidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> aos ditiocarbimatos	30
2.2 Produção de uredosporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> e condução das plantas de soja.....	30

2.3 Efeito dos ditiocarbimatos no controle da FAS em condições de casa-de-vegetação	31
2.4 Análise estatística	32
3. RESULTADOS	32
3.1 Sensibilidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> aos ditiocarbimatos	32
3.2 Efeito dos ditiocarbimatos no controle da FAS em condições de casa-de-vegetação	36
4. DISCUSSÃO	39
4.1 Sensibilidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> aos ditiocarbimatos	39
4.2 Efeito dos ditiocarbimatos no controle da FAS em condições de casa-de-vegetação	39
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS	41

RESUMO

SILVA, Lucas Fagundes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Potencial de controle das ferrugens do cafeeiro e asiática da soja com novas moléculas do grupo de fungicidas ditiocarbimatos.** Orientador: Laércio Zambolim.

A ferrugem-do-cafeeiro (FC) causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br e a ferrugem-asiática-da-soja (FAS) causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow são doenças altamente severas e de difícil controle. Dentre as estratégias de manejo destaca-se o controle químico, considerado um método fundamental em ambos patossistemas. Apesar disso, os últimos grupos de fungicidas foram lançados no mercado nacional há quase 20 anos. Diante desses fatos, é necessário procurar novas moléculas com potencial para o controle da FC e FAZ e que sejam menos tóxicas ao meio ambiente, homem e animais. Nesse sentido, delineou-se este trabalho, para avaliar o comportamento de moléculas do grupo ditiocarbimato no controle da FC e FAS. Para tal, as moléculas 1A, 2A, 1B e 2B (“B” =cátion tetrabutilamônio, “A” =cátion tetrafenilfôsfônio, “1” =4-clorofenila e o “2” =grupo metila) representantes dos ditiocarbimatos foram sintetizadas e submetidas a testes de sensibilidade para obtenção da concentração inibitória de 90% da germinação dos uredosporos (IC₉₀). Os valores de IC₉₀ similares obtidos através da análise de regressão logística entre os ditiocarbimatos e o controle positivo mancozebe, possibilitaram o desdobramento para ensaios em casa-de-vegetação. Sob condições controladas, o potencial de controle foi estudado através da obtenção dos componentes epidemiológicos de cada patossistema e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Para a FC não houve diferença significativa para as variáveis repostas número de lesão/cm², AACPD e produção de esporos entre os compostos 1A, 2A, 1B e o controle padrão mancozebe. Para FAS, as plantas apresentaram sintomas de fitotoxidez quando tratadas com compostos do grupo “B”. Este grupo possui o contra-íon tetrabutilamônio e expressão de fitotoxidez pode estar ligada a liberação do íon amônio em ambiente aquoso. A molécula 2A e mancozebe apresentaram desempenho similar na dose estudada e não houve diferença significativa para as variáveis número de pústulas/cm², AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) e eficiência de controle. Apesar do desempenho inferior, a

molécula 1A também foi capaz de controlar a doença, porém diferiu significativamente do mancozebe e 2A. Em síntese, pode-se destacar o desempenho similar ao controle padrão mancozebe das moléculas 1A, 2A, 1B para controle da FC e da molécula 2A para controlar FAS. Este trabalho mostrou resultados muito promissores para estudos das moléculas do grupo ditiobicarbimato, em condições de campo. Concluí-se que, as moléculas do grupo ditiocarbimato foram eficientes na redução da intensidade da FC e FAS, em condições controladas.

ABSTRACT

SILVA, Lucas Fagundes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Potential for the control of Coffee leaf rust and Asian soybean rust with new molecules of dithiocarbamate fungicide group.** Adviser: Laércio Zambolim.

Coffee leaf rust (CLR) caused by *Hemileia vastatrix* Berk. & Br and Asian soybean rust (ASR) caused by *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow are severe diseases difficult to control. Management strategies include chemical control, considered a fundamental method in both pathosystems. However, the latest groups of fungicides were released to the Brazilian market almost 20 years ago. In view of these facts, it is necessary to seek for new molecules that may represent potential alternatives to control these diseases with lower risk of toxicity to the environment, humans and animals. Considering the lack of new molecules, this work aimed to evaluate the performance of molecules of the dithiocarbamate group in the control of CLR and ASR. For this, four molecules (1A, 2A, 1B and 2B), representative of the dithiocarbamates, were synthesized and subjected to sensitivity tests to estimate the CI_{90} (concentration of the active ingredient necessary to inhibit 90% uredospores germination). A logistic regression analysis indicated similar CI_{90} values for the dithiocarbamates and the positive control mancozeb, which facilitated to conduct trials in the greenhouse. Under controlled conditions, disease control was studied by obtaining epidemiological components for each pathosystem and comparing the means by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$). For CLR, no significant differences were observed in the response variables lesion/cm², AUDPC (area under the disease progress curve) and spore production between compounds 1A, 2A, 1B and the positive control mancozeb.. For ASR, plants exhibited phytotoxicity symptoms when treated with compounds of the group “B”. This group has the cation tetrabutylammonium and expression of phytotoxicity may be related to the release of the ammonium ion in an aqueous environment. The molecule 2A and mancozeb presented similar performance at the dose studied and there was no significant difference between them for the variables pustules/cm², AUPCD and control efficiency. Despite the inferior performance, the molecule 1A was also able to control the disease, but differed

significantly from mancozeb and 2A. In summary, can highlight the performances similar to the positive control mancozeb of 1A, 2A, 1B for the control of CLR and 2A for the control of ASR. These results set precedents for studies of dithiobicarbimate for controlling CLR and ASR under cropping conditions. We conclude in this work that the dithiobicarbimate group was efficient to reduce the CLR and ASR intensity under controlled conditions.

INTRODUÇÃO GERAL

Ferrugem-do-cafeeiro

O café (*Coffea arabica*, Lineu), pertencente à família botânica das Rubiáceas, é uma das culturas mais importantes para o Brasil. Atualmente, o país é o principal produtor mundial de café arábica, com uma safra estimada em torno de 37 milhões de sacas e uma área plantada de aproximadamente 1,78 milhão de hectares, equivalente a 81% da produção nacional de café (Conab, 2017a). A produção do estado de Minas Gerais corresponde a cerca de 70% da produção nacional de café arábica (Conab, 2017a). A cadeia produtiva do café gera 8 milhões de empregos e corresponde a 7% das exportações brasileiras. Além disso, a cultura contribui de maneira expressiva para o equilíbrio da balança comercial do Brasil, com uma receita de 6 bilhões de reais, ocupando a quinta posição nas exportações do agronegócio brasileiro (Mapa, 2017a).

Em todo o mundo, a produção de café é limitada por diversos fatores, dentre estes, as doenças constituem um dos principais problemas fitossanitários da cultura. Dentre as doenças que reduzem a produção de café, a ferrugem-do-cafeeiro (FC) causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, é considerada a mais importante (Zambolim, 2016).

No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1970 no sul da Bahia e rapidamente disseminou-se para todas as regiões produtoras de café do território brasileiro (Chaves *et al.*, 1970). As perdas na produção podem chegar a cerca de 50%, quando as condições climáticas forem favoráveis (Zambolim *et al.*, 2002). Os sintomas iniciam-se com manchas cloróticas translúcidas na face abaxial e após alguns dias surgem pústulas contendo uredosporos. A lesão também pode ser visualizada na face adaxial em correspondência à face abaxial, mas sem a formação de esporos. Com o passar do tempo, surge uma área necrótica no centro das lesões. Em anos de alta carga de frutos, quando a epidemia da doença é mais severa, ocorre desfolha precoce e seca dos ramos. Com isso a produção do ano seguinte fica comprometida (Zambolim, 2016).

O fungo é biotrófico, portanto um parasita obrigatório, pertencente à classe Basidiomycota, ordem Pucciniales, capaz de infectar somente plantas do gênero

Coffea. São conhecidos três tipos de esporos sexuais produzidos pelo patógeno: teliósporos, uredosporos e basidiósporos, sendo que os uredosporos dicarióticos ($n + n'$) são considerados os mais importantes na epidemiologia da doença (McCain e Hennem, 1984). O ciclo de vida inicia pela germinação dos uredosporos, na superfície abaxial das folhas com orvalho. Cada uredosporo ao germinar produz um tubo germinativo, e na sua extremidade, uma estrutura denominada apressório. Ao entrar em contato com células estomáticas, o apressório origina uma hifa de penetração e atravessa o ostíolo estomático. Em seguida, a hifa de penetração diferencia-se para micélio e inicia a colonização intercelular do mesófilo (McCain e Hennem, 1984). O fungo penetra nos espaços intercelulares e parede celular das células da planta, mas não atravessa a membrana plasmática. Em seguida forma uma estrutura denominada haustório, cuja função é a retirada de nutrientes das células da planta para nutrir o fungo.

A dispersão dos uredosporos ocorre pela ação do vento, a longas distâncias e, dentro da planta, pelos respingos de água de chuva. Os uredosporos, ao cair na face inferior das folhas na presença de água no estado líquido germinam e iniciam novo ciclo da doença. Nas urédias, no final do ciclo da doença, esporadicamente pode surgir a télia contendo teliósporos hialinos, que são diploides ($2n$). Os teliósporos sexuais podem germinar e após diferenciação meiótica formam basidiósporos (n). Entretanto, os basidiósporos não são capazes de infectar o cafeeiro e as suas funções não estão bem estabelecidas no ciclo de vida do fungo (Fernandes, *et al* 2009).

Quando a variedade de café arábica é suscetível, o ciclo da doença continua até a formação de lesões contendo cada, uma urédia ou pústula, na face inferior das folhas, saindo pelos estômatos. As urédias produzem uredosporos, que são os esporos assexuados, responsáveis pela multiplicação e consequentemente a epidemia da doença (Silva *et al*, 2002). Quando a doença atinge alta severidade, ocorre a coalescência das lesões (urédias), que podem cobrir mais de 50 % da superfície foliar.

O patossistema *C. arabica* x *H. vastatrix* é considerado complexo e vários fatores influenciam a intensidade da doença em campo. A doença é mais severa em temperaturas entre 20 e 25 °C, alta umidade, desequilíbrio nutricional e o plantio adensado de cultivares altamente suscetíveis (Capucho *et al.*, 2013). Dentre as estratégias de controle, o uso racional de fungicidas é considerada uma das medidas

mais importantes. Os principais compostos registrados para o controle da doença são os fungicidas sistêmicos dos grupos das estrobilurinas, dos triazóis e os protetores cúpricos.

Os fungicidas sistêmicos têm mecanismo bioquímico de ação específico, pois inibem apenas uma rota metabólica do fungo, sendo considerados de alto risco para selecionar mutantes resistentes na população de *H. vastatrix*. Dentre os fungicidas protetores registrados no Mapa, destacam os cúpricos, que são recomendados para aplicação preventiva e possuem mecanismo bioquímico de ação múltiplo. Esse tipo de mecanismo, induz pouca pressão de seleção na população do fungo e, portanto, dificilmente selecionam mutantes resistentes.

Ferrugem-asiática-da-soja

A soja (*Glycine max* L. Merrill), pertencente a família botânica Fabaceae, é considerada a cultura mais importante para o Brasil. A área plantada é de 35 milhões de hectares e os principais estados produtores são Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais (Conab 2017b). O país é destaque no cenário mundial na produção do grão e a safra 2016/2017 foi estimada em 113 milhões de toneladas. O complexo soja é o principal produto de exportação do agronegócio, sendo responsável por 46% das exportações mundiais em 2017 e gerando cerca de US\$ 26 bilhões em divisas cambiais para o país (Mapa 2017b).

Em 2001, a ferrugem-asiática-da-soja (FAS) causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow foi identificada no estado do Paraná, e gradativamente atingiu outras regiões do país, causando grandes perdas aos produtores. Desde então, constitui o principal problema fitossanitário da cultura e as perdas podem chegar a 2 bilhões de dólares por ano (Yorinori *et al.*, 2005).

As condições ideais para o desenvolvimento da doença são temperatura entre 15 e 28°C e molhamento foliar entre 6 e 12 horas. O período latente varia de 7 a 12 dias. Os sintomas são caracterizados por pequenas lesões amarelas, que rapidamente se tornam amarronzadas na face adaxial e abaxial das folhas. Nas lesões são produzidas cerca de quatro a seis urédias, contendo uredosporos do fungo, geralmente na face abaxial da folha, se a variedade de soja for suscetível. Urédias com uredosporos também podem surgir na face superior das folhas, mas em número

muito inferior comparado com a face abaxial. Com o passar do tempo, os sintomas coalescem, as folhas amarelecem e caem prematuramente.

O fungo biotrófico, pertencente a classe Basidiomycota da ordem Pucciniales, é considerado um parasita obrigatório, capaz de infectar mais de 90 espécies de plantas da família botânica Fabaceae (Slaminko *et al.*, 2008). O esporo do patógeno mais importante dentro de um contexto epidemiológico é o uredosporo dicariótico ($n + n'$). Ao atingir a superfície foliar da planta, os uredosporos na presença de água no estado líquido, emitem tubos germinativos na superfície foliar da planta e, na sua extremidade formam apressórios. A partir do apressório, forma-se uma hifa de penetração e com auxílio da força mecânica advinda do apressório, penetra no mesófilo sem a necessidade das aberturas estomáticas, como em outros patógenos causadores de ferrugens (Magnani *et al.*, 2007).

Ao penetrar no espaço intercelular, a hifa do fungo se desenvolve, causando colapso em todo o mesófilo de hospedeiros suscetíveis. Forma-se próximo as membranas das células vegetais estruturas denominadas haustório para nutrir o fungo durante a colonização. Dentro de poucos dias, surgem nas lesões causadas pelo fungo urédias e uredosporos. Eventualmente, nas lesões surgem télia e teliósporos que são subepidérmicas, de forma oval e possuem cerca de 12 μ m de largura.

Em 2004, foi criado o consórcio Anti-Ferrugem cuja finalidade foi desenvolver estratégias, visando o manejo e alertar os produtores sobre o início da epidemia da doença (Consórcio Anti-Ferrugem, 2018). As estratégias de manejo recomendadas devem ser integradas destacando-se a adoção do vazio sanitário, eliminação de hospedeiros alternativos, o emprego de cultivares resistentes, cultivares de ciclo precoce e combinações de fungicidas sistêmicos e protetores (Godoy *et al.*, 2016).

Devido a inexistência de variedades resistentes a doença, a única medida de controle é o emprego de fungicidas. Entretanto, as moléculas capazes de conter as epidemias da doença estão perdendo eficiência paulatinamente, principalmente aos fungicidas com sítios ação específicos, pois ao inibirem a rota metabólica do fungo em apenas uma via, exercem pressão de seleção sobre a população de *P. pachyrhizi* (Godoy *et al.*, 2016).

Já foram detectados vários casos de resistência múltipla aos principais grupos químicos de fungicidas sistêmicos destinados ao controle da doença. Daí, a busca de

novos princípios ativos, tanto do grupo dos sistêmicos quanto de protetores, constitui um grande desafio para a sustentabilidade de todo o complexo da soja no Brasil (Schmitz *et al.*, 2014; Xavier *et al.*, 2015; Twizeyimana *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2018). As empresas estão recorrendo a fungicidas antigos do grupo dos ditiocarbamatos (mancozebe), cúpricos (oxicloreto de cobre) e nitrilas (clorotalonil) para formulações de misturas e misturas em tanque, para aumentar a eficiência de controle e, reduzir o surgimento de mutantes resistentes na população do fungo aos principais grupos de fungicidas, com sitio específicos (Godoy *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015).

Devido a esses fatos, as empresas de agroquímicos estão recorrendo a fungicidas da década de 1950 a 1960 dos grupos dos ditiocarbamatos (mancozebe), cúpricos (oxicloreto de cobre) e nitrilas (clorotalonil) para formulações de misturas e misturas em tanque, para aumentar a eficiência de controle e, reduzir a surgimento de mutantes resistentes, na população do fungo aos principais grupos de fungicidas, com sitio específicos (Godoy *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015).

Tanto a FC quanto a FAS são causadas por patógenos altamente agressivos, causam grandes perdas e são de difícil controle (Zambolim, 2016; Godoy *et al.*, 2016). Diante desses fatos, há necessidade de se procurar novas moléculas, que apresentam potencial para o controle tanto da FC quanto da FAS.

Esse trabalho justifica-se devido à grande importância das culturas do café e da soja para o país. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de fungicidas do grupo ditiocarbimato no controle da FC e da FAS.

REFERÊNCIAS

- Capucho AS, Zambolim L, Cabral PGC, Caixeta ET, Zambolim EM (2013) Climate favourability to leaf rust in Conilon coffee. *Australas Plant Pathology* 42:511–514. doi: 10.1007/s13313-012-0187-6.
- Chaves MG, da Cruz Filho J, Carvalho MG, Matsuoka K, Coelho DT, Shimoy CA (1970) Ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk) Revisão de literatura com observações e comentários sobre a enfermidade no Brasil. *Seiva* 30:1–75.

CONAB 2017a – Levantamento de safra da cultura do café - <http://www.conab.gov.br>.

CONAB 2017b – Levantamento de safra da cultura da soja - <http://www.conab.gov.br>.

Consórcio Anti-Ferrugem 2018 - <http://www.consortioantiferrugem.net/#/main>.

Fernandes RDC, Fernandes RDC, Evans HC, Barreto W (2009) Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination Tropical Plant Pathology 34:108–113. doi: 10.1590/S1982-56762009000200005.

Godoy CV, Seixas CDS, Soares RM, Marcelino-Guimarães FC, Meyer MC (2016) Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. Pesquisa Agropecuária Brasileira 51:407–421. doi: 10.1590/S0100-204X2016000500002.

Magnani EBZ, Alves E, Araújo D V. (2007) Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. Fitopatologia Brasileira 32:156–160. doi: 10.1590/S0100-41582007000200011.

McCain JW, Hennen JF (1984) Development of the uredinal talo and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. Phytopathology 74:714–721.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) 2017a - <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura>-

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) 2017b - <http://www.agricultura.gov.br/noticias/soja-em-graos-bate-recorde-em-volume-exportado-para-os-meses-de-novembro>

Silva LHCP da, Campos HD, Silva JRC, Reis EM (2015) Control of Asian soybean rust with mancozeb, a multi-site fungicide. Summa Phytopathologica 41:64–67. doi: 10.1590/0100-5405/1957

Silva MC (2002) Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves.

- Schmitz HK, Medeiros CA, Craig IR, Stammer G (2014) Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. Pest Management Science 70:378–388. doi: 10.1002/ps.3562.
- Simões K, Hawlik A, Rehfus A, Gava F and Stammer G (2018) First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. J Plant Diseases Prot 125:21–26. doi: 10.1007/s41348-017-0117-5.
- Slaminko TL, Miles MR, Frederick RD, Bonde MR, Hartman GL (2008) New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. Plant Disease Journal 92:767–771. doi: 10.1094/pdis-92-5-0767.
- Twizeyimana M, Hartman GL (2017) Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates to fungicides and reduction of fungal infection based on fungicide and timing of application. Plant Diseases 101:121–128. doi: 10.1094/PDIS-04-16-0552-RE.
- Xavier SA, Koga LJ, Barros DCM, Canteri MG, Lopes ION and Godoy CV (2015) Variação da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da desmetilação no Brasil. Summa Phytopathology 41:191–196. doi: 10.1590/0100-5405/2068.
- Yorinori JT, Paiva WM, Frederick RD, Costamilan LM, Bertagnolli PF, Hartman GE, Godoy CV, Nunes J (2005) Epidemics of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003 J. Plant Diseases 89:675–677. doi: 10.1094/PD-89-0675.
- Zambolim L, Vale FXR, Costa H Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. O Estado da arte de tecnologias de produção de café. Viçosa. Editora UFV. Pag. 369-450. 2002.
- Zambolim L (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. Tropical Plant Pathology 41:1–8. doi: 10.1007/s40858-016-0065-9.

CAPÍTULO I

CONTROLE DA FERRUGEM-DO-CAFEEIRO COM MOLÉCULAS DO GRUPO DITIOCARBIMATO EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

1. INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, a produção de café é limitada por diversos fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores bióticos, a ferrugem-do-cafeeiro (FC) causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br é considerada a principal doença da cultura. O patógeno está presente em todas regiões do mundo onde o café é cultivado. No Brasil a doença ocorre tanto em café arábica quanto em canéfora, em altitudes de 100 a 1500 m ao nível do mar.

Os danos causados pela doença variam de 35 a 50% sob condições climáticas favoráveis (Zambolim 2016). É favorecida por temperatura entre 22 e 25°C e alta umidade relativa, com molhamento foliar superior a 24 horas (Zambolim, 2016).

Os sintomas iniciam-se com manchas cloróticas translúcidas na face abaxial, tornando-se perceptíveis na face adaxial com o coalescimento das lesões. Logo após alguns dias, surge uma área necrótica no seu centro. As urédias com uredosporos surgem na face inferior pelos estômatos. Em epidemias severas, ocorre desfolhas provocadas pelo patógeno, reduzindo a capacidade dos ramos produzirem grãos na safra seguinte.

A implantação de cultivares resistentes para a produção de café é considerada a principal estratégia de controle, mas inúmeros fatores agronômicos limitam a sua utilização. Dentre os fatores limitantes, destacam-se a alta variabilidade genética das populações de *H. vastatrix* no Brasil e o tempo elevado para disponibilização de cultivares resistentes além da falta de adaptabilidade nas diferentes regiões cafeeiras do País.

Normalmente, o tempo para o desenvolvimento para novas cultivares são superiores a 15 anos e inviabiliza a utilização de cultivares no mesmo tempo-espço do surgimento das epidemias. Estes fatos implicam em um cenário de risco. Já foram

identificadas mais de 17 raças fisiológicas de *H. vastatrix* no Brasil (Zambolim 2016).

Como no Brasil, existe grande variabilidade na população do patógeno, as condições climáticas favoráveis e a maioria das variedades de café arábica cultivada altamente suscetíveis à FC (Mundo Novo, Bourbon e Catucaí), haverá sempre a necessidade do emprego de controle químico da doença, que associe estratégias anti-resistência. Portanto, fungicidas protetores multi-sítios, sempre devem ser recomendados no controle da doença, em mistura ou alternados com fungicidas sistêmicos, visando minimizar ou até mesmo eliminar o risco de surgimento de mutantes resistentes na população do fungo (Chalfoun *et al.* 1999; Cabral *et al.*, 2009, Maia *et al.*, 2013; Zambolim, 2016; Souza *et al.*, 2017).

Os fungicidas multi-sítios considerados eficientes, disponíveis para o controle da FC são os cúpricos (Sousa *et al.* 2017). Entretanto, como o cobre é um metal pesado que pode comprometer o meio ambiente, há sempre a necessidade de identificar novas moléculas, que tenham maior aceitação pela sociedade e que não seja recalcitrante.

Neste contexto, pesquisas que visem ampliar o número de princípios ativos, para o controle da FC são muito importantes. Dentre as pesquisas, destacam-se, os estudos que já evidenciaram o potencial do grupo químico dos ditiocarbimatos em inibir o crescimento micelial de fungos das espécies *Colletotrichum gloeosporioides* e *Botrytis cinerea* (Bottega *et al.*, 2013, Oliveira *et al.*, 2015). Entretanto, estes trabalhos estão restritos a testes *in vitro* e não é conhecido o controle em testes envolvendo o patossistema *C. arabica* x *H. vastatrix*.

Considerando as grandes perdas provocadas pela FC e a necessidade de aumentar o número de moléculas fungicidas para o controle dessa doença, delineou-se esse trabalho, com o objetivo de avaliar os ditiocarbimatos para o controle da FC em condições de casa-de-vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Síntese e caracterização dos ditiocarbimatos

A síntese dos ditiocarbimatos foi constituída por duas etapas (Amim *et al.*, 2011). A primeira etapa consiste na produção dos precursores dos ditiocarbimatos de

potássio. Em um balão de fundo redondo foram adicionados 10 mmol de metanossulfonamida (percursor do grupo metila) ou de 4-clorobenzenossulfonamida (percursor do grupo 4-clorofenila), 20 mL de *N,N*-dimetilformamida, 0,60 mL de dissulfeto de carbono (10 mmol) e 1,32 g de KOH (20 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação até o consumo dos cristais de KOH, indicando o fim da reação. Em seguida, foram adicionados 20 mL de etanol absoluto e o balão foi colocado em banho de gelo. Os precipitados amarelos resultantes da reação foram filtrados, posteriormente lavados com etanol, acetato de etila e éter dietílico e foram deixados em um dessecador. Ao final desta reação foram obtidos como produtos o metilsulfonilditiocarbimato de potássio e o 4-clorofenilsulfonilditiocarbimato de potássio.

A segunda etapa consistiu na estabilização dos ditiocarbimatos a partir da formação de complexos de zinco. Para realizar a síntese dos complexos de zinco foram adicionados em um balão de fundo redondo 1 mmol do ditiocarbimato de potássio, 20 mL de solução MeOH/H₂O (1:1 v/v) 0,5 mmol de sulfato de zinco dissolvido em 4 mL de H₂O.

A mistura reacional permaneceu sob agitação durante 1 hora. Em seguida foi adicionado 1 mmol do sal do contra-íon (cloreto de tetrafenilfôsfônio ou de tetrabutilamônio) dissolvido em água, gota a gota. O precipitado formado foi filtrado em um funil de placa porosa de porcelana, lavado 5 vezes e posteriormente foi seco sob pressão reduzida por 24hs. Os produtos das sínteses foram 4 sais de zinco (1A, 2A, 1B e 2B) (Figura 2) contendo o ânion bis(*N*-R-sufonil-ditiocarbimato) zincato (II) em interação eletroestática com os contra-íons de tetrafenilfosfônio ou tetrabutilamônio. Nas extremidades dos ânions há o elemento cloro ou o grupo metila. Estes sais foram utilizados nos experimentos.

Desta forma, as 4 moléculas (1A, 2A, 1B e 2B) produtos da síntese foram divididas de acordo com as respectivas estruturas químicas, sendo que o grupo “B” possui cátion tetrabutilamônio, enquanto o grupo “A” tem o cátion tetrafenilfôsfônio. Já o grupo “1” tem 4-clorofenila nas extremidades e o “2” tem o grupo metila.

2.2 Sensibilidade de *Hemileia vastatrix* aos ditiocarbimatos

Foram realizados dois experimentos *in vitro* com delineamento inteiramente casualizado (DIC), três repetições e os tratamentos constituídos por mancozebe (Sigma Aldrich®), 1A, 2A, 1B e 2B nas concentrações 0.2, 0.1, 0.05, 0.005, 0.0005 mmol.L⁻¹, além dos controles com meio ágar-água, DMSO a 0,5% (v/v) e Tween 80 a 0,5% (v/v). O cálculo estequiométrico para obtenção das doses foi baseado nas seguintes massas molares (g.mol⁻¹) dos compostos: 2B = 888,78, 2A = 1081,81, 1A = 1275,66, 1B = 1082,64 e mancozebe = 266,51.

Uma massa de 0,01 g (valor maior que o somatório das massas de cada composto) de cada substância foi dissolvida em 10 mL de diclorometano, exceto o mancozebe e o volume correspondente a cada concentração foi transferido com pipetas (1000, 100, 50, 10 e 2 µL) para balões de fundo redondo de 50 mL. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A cada balão foram adicionados DMSO e Tween 80, dissolvendo-se os compostos em teste, de forma que a quantidade final desses solventes fosse igual a 0,5% (v/v), cada.

Essas soluções foram homogeneizadas em meio ágar-água a 2% e as misturas foram distribuídas em três placas de Petri 60 x 15 mm. Uma alíquota de 0,1 mL de 10⁵ uredosporos.mL⁻¹ de *H. vastatrix* foi espalhada em cada placa. As placas foram mantidas a 25°C, sob escuro contínuo em câmara tipo B.O.D. Após 24 horas, aleatoriamente, foi avaliada a germinação de 100 uredosporos por placa, empregando-se microscópio óptico no aumento de 400 vezes. Os valores médios, referentes ao experimento de sensibilidade *in vitro* foram coletados para o cálculo da percentagem de inibição da germinação dos uredosporos, por meio da equação:

$$\text{Inibição (\%)} = \left(\frac{G_c - G_t}{G_c} \right) * 100, \text{ onde:}$$

G_c = Esporos germinados no tratamento controle com DMSO e Tween 80

G_t = Germinação total de cada observação.

2.3 Produção de uredosporos de *Hemileia vastatrix* e condução das mudas

Sementes da variedade Caturra Vermelho linhagem IAC 144 foram semeadas em areia e mantidas por 28°C. Após trinta dias, as plantas na fase de ‘orelha de onça’ foram selecionadas e transplantadas para vasos de 2 dm³. Os vasos contendo as plantas receberam a cada 15 dias 100 mL de uma solução nutritiva contendo em mg/L os seguintes componentes: 192 de KCl, 104,42 de K₂SO₄, 150,35 de MgSO₄.7H₂O, 61 de ureia, 0,27 de NH₄Mo₇O₂₄.4H₂O, 1,61 de H₃BO₃, 6,67 de

ZnSO₄, 1,74 de CuSO₄.5H₂O, 4,10 de MnCl₂.4H₂O, 4,08 de FeSO₄.7H₂O e 5,58 de EDTA bissódico.

Após 45 dias, o 3º par de folhas foi inoculado com a raça II de *H. vastatrix* pertencente a coleção de raças do Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal de Viçosa. As plantas permaneceram por 48 horas na câmara de nevoeiro, no escuro a 22°C e em seguida foram mantidas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, na mesma temperatura.

Após o 30º dia foram realizadas até três coletas de uredosporos e o fungo foi armazenado em um dessecador a 4°C e 50% de umidade relativa.

2.4 Efeito dos ditiocarbimatos nos componentes epidemiológicos da ferrugem-do-cafeeiro

Foram realizados dois experimentos *in vivo* em DIC. Os tratamentos foram constituídos pelas moléculas do grupo ditiocarbimato 1A, 2A, 1B, 2B, e do fungicida mancozebe e os controles negativos com água e o adjuvante haiten (Arysta ®) na dose de 0,1 mL.L⁻¹. Os demais tratamentos foram aplicados na concentração de 1 mmol.L⁻¹ na face abaxial até antes do ponto de escorrimento no 3º e 4º par de folha das plantas de café.

A inoculação das plantas foi feita pelo método de aspersão na face abaxial das folhas, utilizando uma suspensão na concentração de 10⁵ uredosporos.mL⁻¹ 24 horas após aplicação dos tratamentos e as plantas foram mantidas por 48 horas no escuro em câmara úmida a 22°C com fotoperíodo de 12 horas. Os experimentos foram avaliados a cada 2 dias. As variáveis respostas obtidas foram:

1) Período de Incubação (PI): a avaliação corresponde ao período compreendido da inoculação até a observação da primeira lesão sem esporos.

2) Período Latente (PL): a avaliação corresponde ao período compreendido da inoculação até a observação da primeira lesão com esporos.

3) Produção de Esporos (PE): Os esporos de todas as pústulas foram coletados com auxílio de uma capsula de gelatina e utilizados para preparar a suspensão de uredosporos. Em seguida, foi realizada a contagem dos esporos empregando-se microscópio óptico no aumento de 400 vezes e a concentração ajustada para uredosporos.mL⁻¹.

4) Número de lesões sem esporulação (LSE): contagem das pontuações amarelas sem esporulação.

5) Número de lesões (LE): contagem das pontuações amarelas com esporulação.

6) Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Calculada a partir da integralização dos valores de LE pela equação: $AACPD = (\sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] [t_{i+1} - t_i]) / \Delta t$ em que:

n = número de observações.

Δt = período de avaliação da doença.

Y_i = índice de doença na “ i ”-ésima observação.

t_i = tempo da “ i ”-ésima observação, em dias.

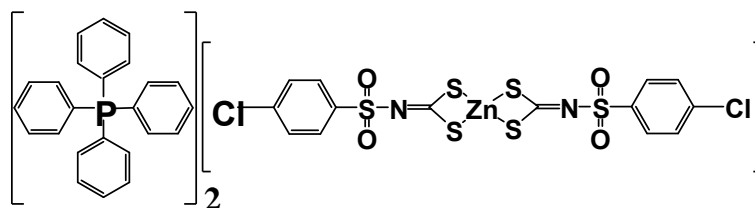
2.5 Análise estatística

Os dados obtidos para o experimento de sensibilidade de *H. vastatrix* aos compostos foram transformados em $\log(x)$ para análise de regressão logística e a concentração inibitória de 90% dos uredosporos (IC_{90}) foi estimada para cada composto. Para obtenção dos componentes epidemiológicos, os dados foram combinados e foram submetidos ao teste de Scott-Knott. Todas as análises foram feitas no software R (R Core Team 2013) usando os pacotes; readr, readxl, plyr, dplyr, drc, stats e easyanova.

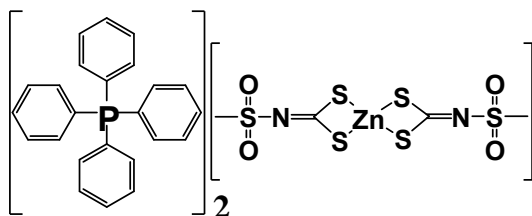
3. RESULTADOS

3.1 Síntese dos ditiocarbimatos

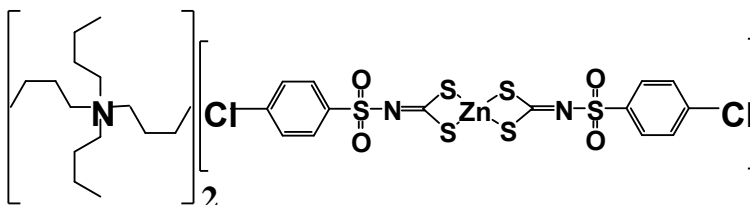
A síntese dos ditiocarbimatos resultou em 4 moléculas denominadas de 1A, 2A, 1B e 2B (Figura 1) com as fórmulas estruturais e nomenclatura descritas abaixo.



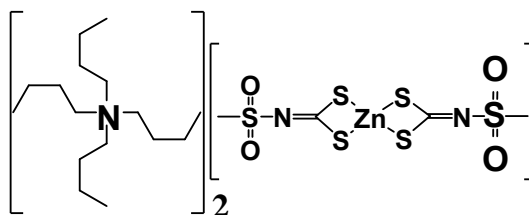
Bis(4-clorofenilsulfonilditiocarbimato)zincato(II) de tetrafenilfosfônio (**1A**)



Bis(metilsulfonilditiocarbimato)zincato(II) de tetrafenilfosfônio (**2A**)



Bis(4-clorofenilsulfonilditiocarbimato)zincato(II) de tetrabutilamônio (**1B**)



Bis(metilsulfonilditiocarbimato)zincato(II) de tetrabutilamônio (**2B**)

Figura 1. Fórmula estrutural dos quatro ditiocarbimatos sintetizados.

3.2 Sensibilidade de *Hemileia vastatrix* aos ditiocarbimatos

As curvas do modelo Logístico foram ajustadas e em seguida foram obtidos os valores de IC_{90} para cada composto (Figura 2). Todas as moléculas dos ditiocarbimatos (1A, 2A, 1B e 2B) propostos neste trabalho apresentaram efeitos inibitórios a raça II de *H. vastatrix*.

Os menores valores de IC_{90} foram obtidos para controle positivo mancozebe (0,011). Dentre as moléculas do grupo “B” o menor valor de IC_{90} foi do tratamento 1B (0,015) e para as moléculas do grupo “A” o menor IC_{90} foi obtido para o tratamento 1A (0,080 e 0,102), respectivamente (Tabela 1).

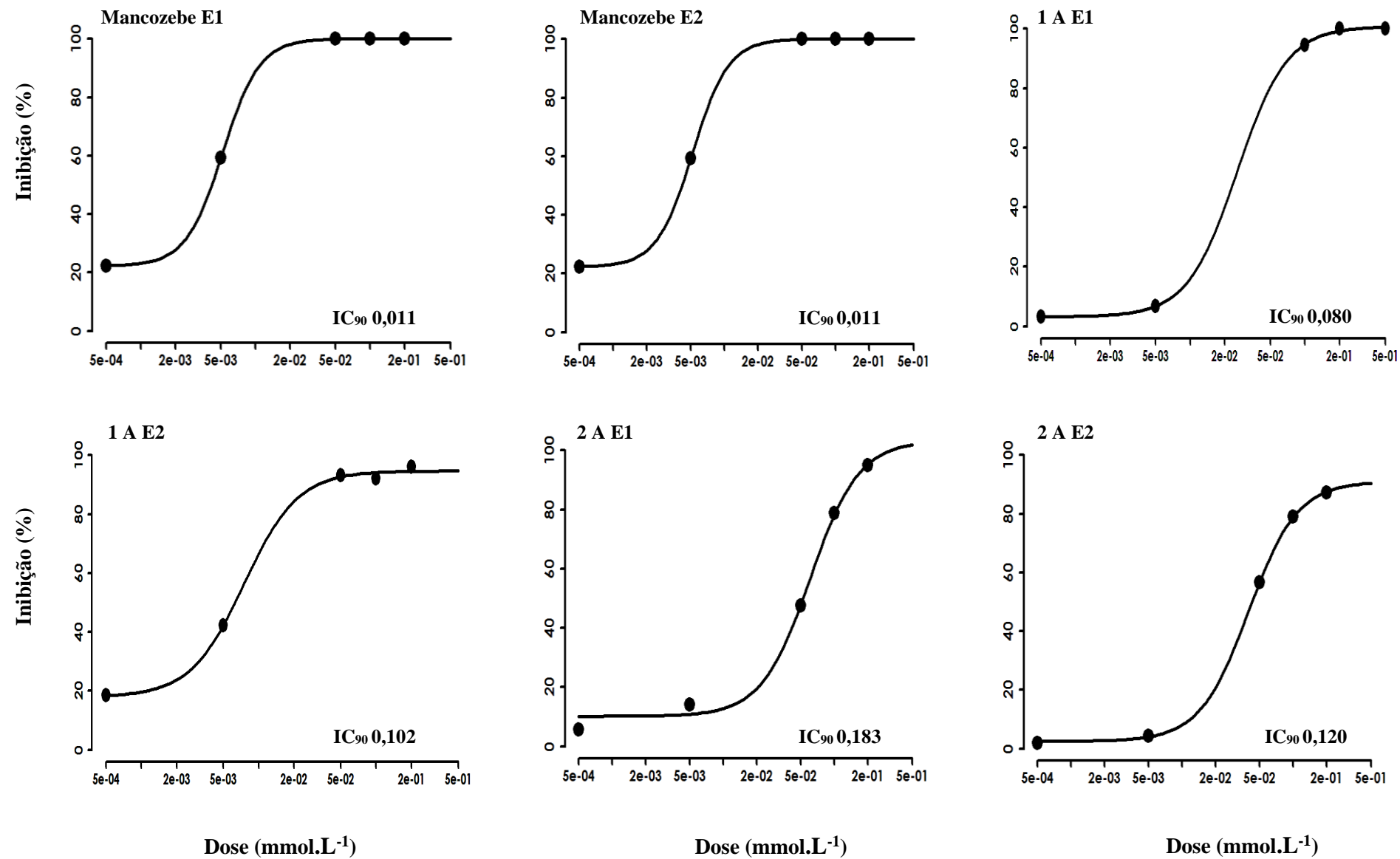
Para a variável $IC_{90\text{comb}}$ (média do IC_{90} dos dois experimentos) não houve diferença significativa entre os tratamentos das moléculas do grupo B (1B e 2B) com o controle mancozebe. Entretanto os tratamentos das moléculas do grupo B (1B, 2B) e mancozebe diferiram das moléculas do grupo “A”. Houve diferença significativa entre as moléculas 1A e 2A (Tabela 1).

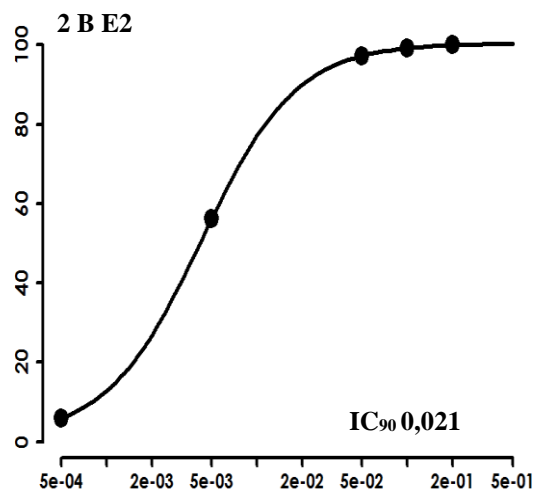
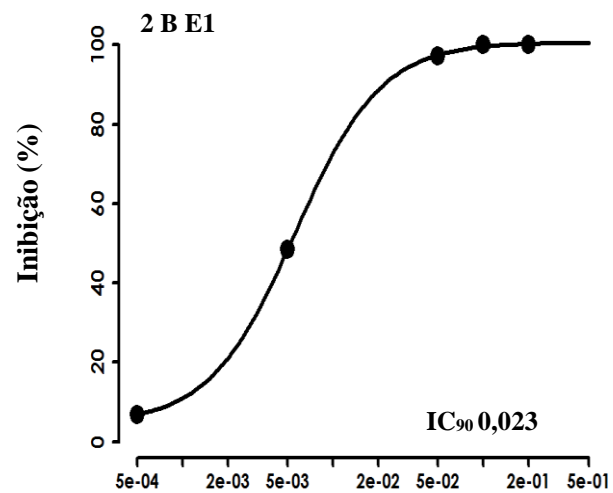
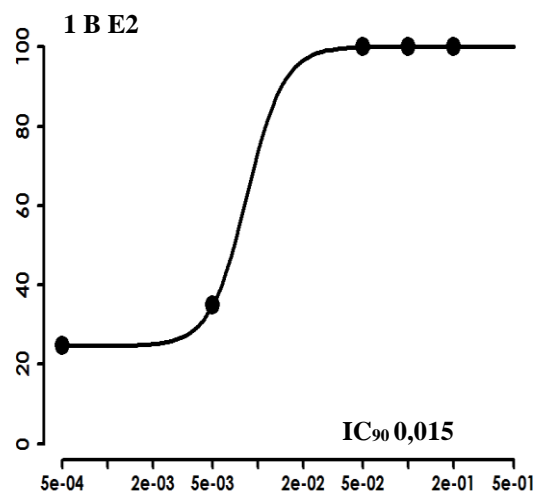
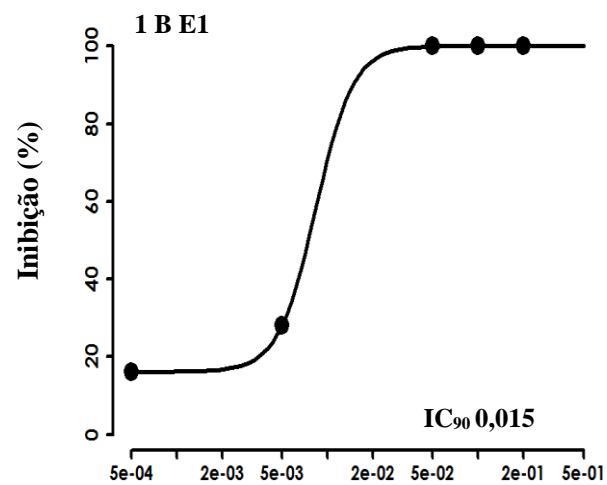
Tabela 1. Valores de IC₉₀ (mmol.L⁻¹) para *Hemileia vastatrix* e modelo Logístico $f(y) = c \setminus \{d-c\} \{1^{\exp(b(\log(x)-\log(e)))}\}$

Molécula	Experimento 1			Experimento 2			
	Parâmetros*	R ²	IC ₉₀	Parâmetros*	R ²	IC ₉₀	IC _{90 comb}
Mancozebe	b=-2,7; c= 2,2; d=100,0; e=0,005	0,983	0,011	b=-2,7; c= 22,2; d=100,0; e=0,005	0,973	0,011	0,011 c
1 A	b=-2,0; c= 3,1; d=100,0; e=0,026	0,997	0,080	b=-1,2; c= 02,2; d=100,0; e=0,017	0,987	0,102	0,091 b
1 B	b=-3,5; c= 24,6; d=100,0; e=0,008	0,965	0,015	b=-3,5; c=24,6; d=100,0; e=0,008	0,933	0,015	0,015 c
2 A	b=-1,9; c= 10,1; d=100,0; e=0,060	0,975	0,183	b=-1,9; c=02,5; d= 100,0; e=0,039	0,998	0,120	0,151 a
2 B	b=-1,5; c= 04,4; d=100,0; e=0,005	0,952	0,023	b=-1,3; c=01,0; d=100,0; e=0,004	0,997	0,021	0,022 c

IC₉₀: Concentração inibitória capaz de inibir a germinação de 90% dos urepodosporos de *Hemileia vastatrix*; IC_{90 comb}: Valores médios de IC₉₀ dos dois experimentos; R²: Coeficiente de determinação ajustado; (*): Parâmetros diferentes de 0 pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$). Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Figura 2. Curvas de da inibição da germinação dos uredoposros de *Hemileia vastatix* e IC₉₀. E1: Experimento 1; E2: Experimento 2.





Dose (mmol.L⁻¹)

Dose (mmol.L⁻¹)

3.3 Efeito dos ditiocarbimatos sobre as variáveis epidemiológicas da ferrugem-do-cafeeiro

O estudo dos componentes epidemiológicos demonstrou o efeito dos tratamentos para controle da doença em condições de casa-de-vegetação (Figura 3).

O período de incubação (PI) considerando o controle com água foi de 16 dias sendo que os tratamentos mancozebe e as moléculas 2A, 2B expressaram sintomas com 24 dias (Figura 4). Todos tratamentos diferiram do controle com água. As moléculas dos ditiocarbimato não diferiram significativamente do controle padrão mancozebe.

Para o PL, o controle com água foi a menor entre os tratamentos com 19 dias e diferiu significativamente dos demais tratamentos. Não houve diferenças entre os ditiocarbimatos e o controle com mancozebe (Figura 4).

Para a variável lesão esporulada (LE), o tratamento controle com água apresentou média de 149 lesões/folha, diferindo significativamente dos demais tratamentos. A média para tratamento 2B foi estimada em 25,0 lesões/folha diferiu significativamente dos tratamentos 1A, 1B, 2B e o mancozebe. Os tratamentos 1A, 1B, 2B e o mancozebe não diferiram significativamente entre si (Figura 4).

Em relação à variável lesão sem esporulação (LSE), o tratamento controle com água apresentou valor médio de 247,00 lesões/folha, diferindo significativamente dos demais tratamentos. A média para o tratamento 2B foi estimada em 27,33 lesões/folha sendo diferente significativamente para os demais tratamentos. Os menores valores médios foram obtidos pelo tratamento mancozebe (1,33) e 1B (1,00). As médias de LSE para tratamentos 1A, 1B, 2B e o mancozebe não diferiram significativamente entre si (Figura 4).

As estimativas para AACPD demonstraram que o tratamento controle com água diferiu significativamente dos demais tratamentos, tendo média 1843,5. O tratamento 2B obteve média de 175,33 e diferiu significativamente dos demais compostos. Os compostos 1A, 1B, 2A e mancozebe não tiveram diferenças significativas entre si (Figura 4).

Os resultados referentes a variável produção de esporos (PE) demonstraram diferença significativa do controle com água (média = 3770 uredosporos.mL⁻¹) para os demais tratamentos. O tratamento 2B teve média estimada de 145,60 uredosporos.mL⁻¹, respectivamente e diferiu significativamente dos demais compostos. Os tratamentos 1A, 1B, 2A e mancozebe não diferiram significativamente entre si (Figura 4).

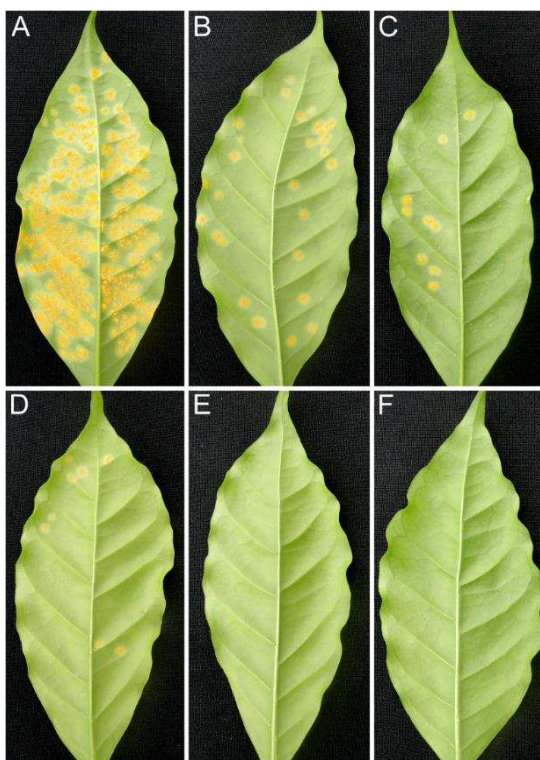


Figura 3. Efeito das aplicações dos tratamentos na formação de pústulas da FC. A: Controle negativo (H₂O); B: 1B; C: 1A; D: 2B; E: 2A; F: Controle positivo (mancozebe).

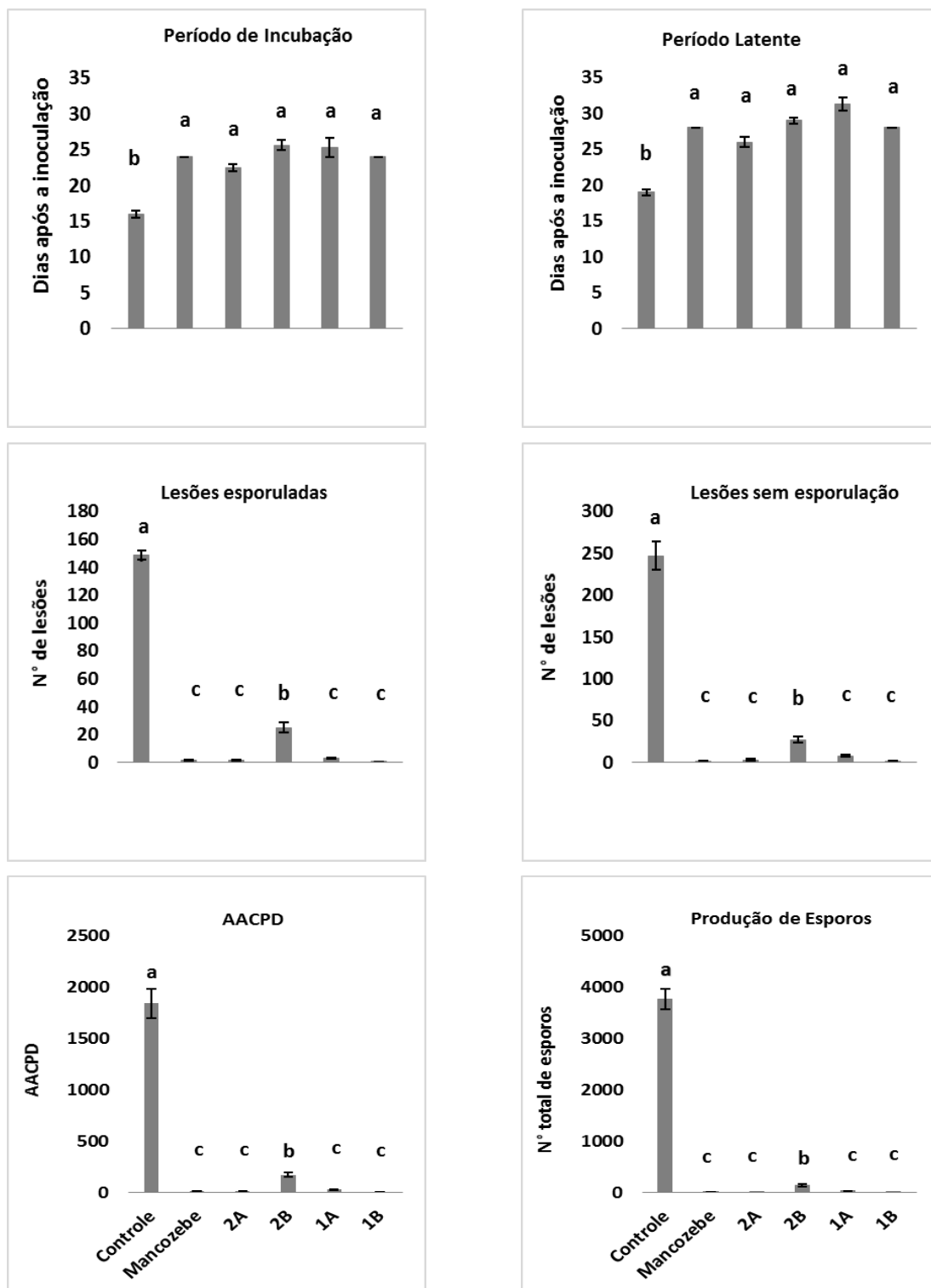


Figura 4. Efeitos dos ditiocarbimatos a 1 mmol.L⁻¹ sobre as variáveis epidemiológicas da FC. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1 Sensibilidade de *Hemileia vastatrix* aos ditiocarbimatos

Todos compostos apresentaram efeitos inibitórios a germinação de esporos de *H. vastatrix*. A análise da variável do IC_{90comb} obtidos pelas curvas dos dois experimentos demonstrou que os tratamentos 1B e 2B tiveram desempenho similar ao controle padrão mancozebe. Entretanto, os compostos do grupo “A” foram menos eficientes para inibir a germinação do fungo em relação aos compostos do grupo B e o controle com mancozebe (Tabela 1).

As diferenças no parâmetro IC_{90} entre os tratamentos encontradas nesse podem ser explicadas por fatores inerentes a fisiologia e genética do fungo. Kretschmer em 2009, utilizando *Botrytis cinerea* como modelo, relatou que os fungos respondem ao estresse causado pelos fungicidas pela alteração do sítio-alvo, desintoxicação do fungicida, super-expressão do alvo com aumento de moléculas de fungicidas no citosol e pelo efluxo de fungicidas do sítio alvo.

Geralmente, os novos candidatos a fungicida são selecionados através de ensaios *in vitro*, por comparações com fungicidas eficientes para o controle de doenças. Neste trabalho optou-se pelo mancozebe, por três motivos enumerados abaixo:

1. O mancozebe é classificado como um fungicida multi-sítios, e o mecanismo bioquímico de ação, está relacionado com a interação de sítios -SH presente nas estruturas das proteínas (FRAC, 2017; Sisler e Ragsdale, 1986). Possivelmente, a analogia das estruturas dos ditiocarbimatos e os ditiocarbamatos, evidencia que esses grupos, possam utilizar o mesmo mecanismo, para inibir rotas metabólicas dos fungos;

2. Trata-se de um produto amplamente utilizado na agricultura, para controle de doenças causadas por fungos e a sua utilização têm aumentado em misturas comerciais para controle de ferrugens (Godoy *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2008). No caso da FC, os principais fungicidas multi-sítios utilizados são os a base de cobre (Zambolim, 2016; Souza *et al.*, 2011). Entretanto, o íon cobre pode apresentar danos a produção de fotoassimilados ao destruir os cloroplastos e afetar o fotossistema II, além de contaminar e acumular no meio ambiente, quando usado em doses indiscriminadas (Krofta *et al.*, 2012; Petit *et al.*, 2012). Há também tendência

mundial na agricultura para abandonar o emprego de produtos que tenham metal pesado na sua composição como o cobre e o estanho;

3. O mancozebe é um etilenobisditiocarbamato derivado do ácido ditiocarbâmico e produz metabólitos advindos da sua degradação, como um fator limitante. Moléculas deste grupo tem como característica serem precursores de metabólitos carcinogênicos ao homem, como o etileno tioureia (ETU) e as nitrosaminas (Mrema *et al.*, 2014; Caldas *et al.*, 2004).

4.2 Efeito dos ditiocarbimatos sobre as variáveis epidemiológicas da ferrugem-do-cafeeiro

Os resultados promissores dos compostos 1A, 2A, 1B e 2B nos testes de inibição da germinação *in vitro*, possibilitaram avançar no estudo do comportamento desse grupo químico, no controle da FC, para testes *in vivo* em condições controladas. Foram delineados 2 experimentos para obtenção das variáveis epidemiológicas LSE, LE, PI, PL, PE e AACPD (Figura 4).

Os resultados dos estudos com as variáveis epidemiológicas mostraram que os ditiocarbimatos apresentam eficácia similar ao controle positivo mancozebe. Destacaram-se nas análises das variáveis os compostos 2A, 1B e 1A (Figura 4). Obteve-se os maiores valores de PI e PL e menor valor de PE para essas moléculas, sugerindo que estes compostos do grupo dos ditiocarbimatos podem reduzir os ciclos da doença eficientemente (Leclerc *et al.*, 2014). O próximo passo, será avaliá-los em condições de campo, visando estudar o tempo de degradação na superfície foliar e o número de dias que tais produtos protegem as plantas do ataque da FC.

Comumente, maiores valores estimados das variáveis PI e PL concomitantemente com menores de PE indicam que as epidemias da FC terão menores valores para taxa de progresso (*r*) e, provavelmente o efeito na produção, não seria tão pronunciado. Por outro lado, menores valores estimados de PI e PL combinados com maiores valores PE, podem evidenciar um elevado risco de epidemia precoce, potencializando o risco de dano, na safra do segundo ano de produção, pelo fato de cafeeiro ser uma planta bienal. Quando o controle químico é ineficiente, a doença reduz os rendimentos da safra seguinte e as perdas tendem a ser mais graves (Souza *et al.* 2011, Talhinhos *et al.*, 2017). A ineficiência do controle

químico é devida a maior pressão de inóculo, pelo aumento da LE e AACPD nos novos sítios de infecção.

Os compostos ditiocarbimato foram eficazes para inibir a germinação de uredosporos e para reduzir a intensidade da doença. Entretanto, o tratamento 2B foi o ditiocarbimato com menor intensidade de controle para as variáveis LSE, LE e AACPD. Essas diferenças podem estar ligadas ao fato dos tratamentos possuírem diferenças estruturais importantes e as mais relevantes consistem em: i) os compostos 1B e 2B possuem o cátion tetrabutilamônio, enquanto os tratamentos 1A e 2A possuem o cátion tetrafenilfosfônio; ii) presença do grupo metila nos compostos 2A e 2B, e presença do 4-clorofenila em 1A e 1B. A priori, essas diferenças estruturais podem mudar aspectos físicos que influenciem dispersão em água e a interação com a parede celular.

A solubilidade em água dos compostos para preparo da calda de pulverização podem ser um fator que influenciou o controle da doença. Outro ponto de destaque é que complexos lipofílicos orgânicos com cadeias alifáticas ou aromáticas podem interagir com a bicamada lipídica da membrana plasmática, camadas de ceras, epidermes e cutículas (Pinney *et al.*, 1997). Para elucidar se existem diferenças na solubilidade em água dos compostos, torna-se necessário estimar parâmetros que quantifiquem a lipofilicidade dos compostos, como o $\log P$. Estudos que discriminam valores ótimos de constantes, como o $\log P$, poderiam elucidar o equilíbrio de regiões apolares e polares dos compostos, predizer o quanto os compostos são solúveis em água e refinar o seu uso em meio aquoso (Benfenati *et al.*, 2003).

A natureza hidrofóbica dos compostos 1A, 2A, 1B e 2B permite interação com estruturas lipídicas presentes na superfície das folhas das plantas e consequentemente, pode ter ocorrido, diferenças na adesão dos compostos na superfície foliar (Hunsche *et al.*, 2006). A adesão dos compostos na superfície foliar é muito importante para o controle eficiente de doenças, principalmente, em folhas cerosas como a do cafeeiro e poderia explicar as diferenças de controle entre os compostos (Oliveira *et al.*, 2002).

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as novas moléculas do grupo ditiocarbimato (1A, 2A e 1B) constituem mais uma opção, para o controle da ferrugem do cafeeiro, com eficiência de controle similar ao produto padrão mancozebe.

6. REFERÊNCIAS

- Amim RS, Oliveira MRL, Janczak J, Rubinger MMM, Vieira LMM, Alves LC, Zambolim L (2011) Syntheses, characterization, crystal structure and antifungal activity of four tetraphenylphosphonium bis (N-R-sulfonyldithiocarbimato zincate(II) salts. *Polyhedron* 30:683–689. doi: 10.1016/j.poly.2010.12.003.
- Benfenati E, Gini G, Piclin N, Roncaglioni A, Vari MR (2003) Predicting logP of pesticides using different software. *Chemosphere* 53:1155–1164. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00609-X.
- Bottega FC, Oliveira MRL, Garcia CV, Menezes DC (2013) Syntheses, characterization and antifungal activity of tris(1,10-phenanthroline) iron(ii) bis(n-r-sulfonyldithiocarbimate)zincate(ii) *Quimica Nova* 803-807. doi: 36:803–807.
- Caldas ED, Miranda MCC, Conceição MH, De Souza LCKR (2004) Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. *Food Chemical Toxicology* 42:1877–1883. doi: 10.1016/j.fct.2004.07.006.
- Chalfoun SM, De Carvalho VL (1999) Controle químico da ferrugem (*Hemileia vastatrix* berk & br.) do cafeeiro através de diferentes esquemas de aplicação. *Pesqui Agropecu Bras* 34:363–367. doi: 10.1590/S0100-204X1999000300006.
- Cabral PGC, Zambolim EM, Zambolim L, Lelis TP, Capucho AS. and Caixeta ET (2009) Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil Australasian Plant Disease Notes 4 129–130 doi: 1833-928X/09/010129.

- Duarte HDSS, Zambolim L, Rodrigues FA, Rios JA (2008) Efeito do silicato de potássio isoladamente ou em mistura com fungicida no controle da requeima da batateira. *Summa Phytopathologica* 34:68–70. doi: 10.1590/S0100-54052008000100014.
- FRAC 2017 - <http://www.frac.info/working-group/ap-fungicides/introduction-and-general-information>.
- Godoy CV, Utiamada CM, Meyer MC, Campos HD, Forcelini CA, Pimenta CB, Filho DSJ (2016) Eficiência de fungicidas multissítios no controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra: Embrapa 1-7.
- Hunsche M, Bringe K, Eiberge MS and Noga G (2006) Leaf surface characteristics of apple seedlings, bean seedlings and kohlrabi plants and their impact on the retention and rainfastness of mancozeb *Pest Management Science* 62:839–847.
- Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A, Walker A, Fillinger S, Mernke D, Schoonbeek H, Pradier J, Leroux P, Waard M and Hahn M (2009) Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*.. doi: 10.1371/journal.ppat.1000696.
- Krofta K, Pokorný J, Kudrna T, Ježek J, Pulkrábek J, Křivánek J, Bečka D (2012) The effect of application of copper fungicides on photo-synthesis parameters and level of elementary copper in hops. *Plant, Soil Environ* 58:91–97.
- Leclerc M, Doré T, Gilligan CA, Lucas P, Filipe J A N (2014) Estimating the delay between host infection and disease (incubation period) and assessing its significance to the epidemiology of plant diseases. *PLoS One* 9:. doi: 10.1371/journal.pone.0086568.
- Maia TA, Maciel-Zambolim E, Caixeta ET, Mizubuti ESG and Zambolim L (2013) The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australas Plant Pathol* 42:533–542. doi: 10.1007/s13313-013-0213-3.

- Mrema EJ, Colosio C, Rubino FM (2014) Pesticide Residues: Organochlorines. *Encycl Food Saf* 3:23–30. doi: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00238-9.
- Oliveira AA, Oliveira MRL, Rubinger MMM, Pilóa EL, Meneses DC and Zambolim L (2015) Bis(4-fluorophenylsulfonyldithiocarbimato) zincate(ii) salts: new antifungals for the control of *Botrytis* blight *Quim. Nov* 757-761 doi.org/10.5935/0100-4042.20150075.
- Oliveira SHF, Santos JMF, Guzzo SD (2002) Efeito da chuva sobre a tenacidade e eficiência de fungicidas cúpricos associados ao óleo vegetal no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fit Bras* 27:581–585. doi: 10.1590/S0100-41582002000600004.
- Petit AN, Fontaine F, Vatsa P, Clement C, Vaillant-Gaveau N (2012) Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. *Photosynth Res* 111:315–326. doi: 10.1007/s11120-012-9719-8.
- Pinney J, Ruland K (1997) Trace metal exchange in solution by the fungicides ziram and maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc , copper and lead complexes into phytoplankton cells. 16:2046–2053.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sisler HD, Ragsdale NN (1986) Mode of Action and Selectivity of Fungicides. *Agric Chem Future*.
- Souza AF, Zambolim L, De Jesus Júnior VC, Cecon PR (2011) Chemical approaches to manage coffee leaf rust in drip irrigated trees. *Australas Plant Pathol* 40:293–300. doi: 10.1007/s13313-011-0046-x.
- Sousa TV, Caixeta ET, Alkimim ER, Oliveira R , Pereira ACB, Alves A, Zambolim L, Sakiyama NS (2017) Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica* 213:. doi: 10.1007/s10681-017-1865-9.

Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A, Tavares S, Pereira AP, Azinheira HG, Guimarães LG, Varzea V and Silva MC (2017) The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology* 18:1039–1051. doi: 10.1111/mpp.12512.

Zambolim L (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Trop Plant Pathol* 41:1–8. doi: 10.1007/s40858-016-0065-9.

CAPÍTULO II

CONTROLE DA FERRUGEM-ASIÁTICA-DA-SOJA COM MOLÉCULAS DO GRUPO DITIOCARBIMATO EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem-asiática-da-soja (FAS) causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow é considerada a doença mais importante e severa da cultura. As perdas na produção são estimadas em 2 bilhões de dólares por ano (Yorinori *et al.*, 2005). O controle químico constitui o método mais importante. Entretanto, as moléculas capazes de conter as epidemias da doença estão perdendo eficiência paulatinamente. Nos últimos 20 anos, não foi lançado nenhum grupo de fungicidas com movimento sistêmico e com efeito protetivo na planta, para o controle da ferrugem asiática da soja. Os fungicidas sistêmicos fungicidas têm sítios específicos que inibem ou bloqueiam apenas uma rota metabólica do fungo e necessitam da complementariedade de compostos multi-sítios, para que atuem em diferentes rotas metabólicas do fungo, visando garantir a eficácia de controle (Godoy *et al.*, 2016).

Atualmente, já foram detectados casos de resistências múltiplas aos principais grupos químicos (triazóis, estrobilurinas e dicarboximidas) destinados ao controle da doença e encontrar novos princípios ativos é um grande desafio para a sustentabilidade de todo o complexo soja no Brasil (Schmitz *et al.*, 2014; Xavier *et al.*, 2015; Twizeyimana *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2018).

Daí para dar maior proteção aos fungicidas com mecanismo bioquímico de ação específico, as empresas estão recorrendo a fungicidas multi-sítios desenvolvido na década de 1950-60. Os principais são os ditiocarbamatos (mancozebe) e nitrilas (clorotalonil). Estes fungicidas estão sendo utilizados para controlar a doença e reduzir a pressão de seleção sobre a população de *P. pachyrhizi* (Godoy *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos de pesquisas têm evidenciado *in vitro*, o fato dos ditiocarbimatos inibir o crescimento micelial de fungos das espécies *Colletotrichum gloeosporioides* e *Botrytis cinerea* (Bottega *et al.*, 2013, Oliveira *et al.*, 2015). O

grupo ditiocarbimato é análogo aos ditiocarbamatos, porém não possuem representantes comerciais. Já os ditiocarbamatos são amplamente utilizados na agricultura e o principal representante é o mancozebe. Tais grupos diferem quimicamente, apenas pela existência de uma ligação dupla entre os átomos de carbono e nitrogênio. Neste contexto, destaca-se pesquisas que busquem novas moléculas com boa aceitação pela sociedade para o controle da FAS. Os ditiocarbimatos estão despontando como um grupo de fungicida promissor para compor formulações para controle de doenças em plantas.

Considerando as grandes perdas provocadas pela FAS e a necessidade de encontrar novas moléculas eficientes para o controle dessa doença, delineou-se esse trabalho, com o objetivo de avaliar o potencial dos ditiocarbimatos para o controle da FAS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* aos ditiocarbimatos

A síntese dos ditiocarbimatos (1A, 2A, 1B e 2B) e o experimentos de sensibilidade do fungo *P. pachyrhizi* aos compostos foram realizados de forma análoga a metodologia descrita no capítulo I. O experimento para avaliação da sensibilidade de *P. pachyrhizi* foram *in vitro*, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), arranjo fatorial (5x5x3) e três repetições. O primeiro fator correspondente aos compostos 1A, 2A, 1B, 2B e mancozebe (Sigma Aldrich®). O segundo fator constituiu as doses para cada composto: 0.2, 0.1, 0.05, 0.005, 0.0005 mmol.L⁻¹, além dos controles com meio ágar-água, DMSO a 0,5% (v/v) e Tween 80 a 0,5% (v/v). A massas molares (g.mol⁻¹) dos compostos utilizadas como referência para os cálculos das concentrações foram: 2B = 888,78, 2A = 1081,81, 1A = 1275,66, 1B = 1082,64 e mancozebe = 266,51.

2.2 Produção de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* e condução das plantas de soja

Plantas de soja da variedade TMG 132 foram conduzidas em vasos de 2 cm³ durante todo o experimento. Os vasos de soja receberam quinzenalmente 100 mL de uma solução nutritiva contendo em mg/L os seguintes componentes: 192 de KCl, 104,42 de K₂SO₄, 150,35 de MgSO₄.7H₂O, 61 de ureia, 0,27 de NH₄MO₇O₂₄.4H₂O,

1,61 de H_3BO_3 , 6,67 de $ZnSO_4$, 1,74 de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 4,10 de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 4,08 de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 5,58 de EDTA bissódico. Uredosporos foram coletados na região de Viçosa-MG, inoculados no estágio fenológico V5 e as plantas foram mantidas por 48h na câmara de nevoeiro, no escuro a 22°C. Em seguida as plantas foram colocadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas.

Após o 30º dia foram realizadas até 3 coletas de uredosporos, os quais foram armazenados em um dessecador à 4°C e 50% de umidade durante 30 dias.

2.3 Efeito dos ditiocarbimatos no controle da FAS em condições de casa-de-vegetação

Foram realizados dois experimentos *in vivo* em DIC. Os tratamentos foram constituídos por 1A, 2A, 1B, 2B e mancozebe na dose 0,05 mmol.L⁻¹ e os controles com água e o adjuvante haiten (Arysta ®) na dose de 0,1 mL.L⁻¹. Os tratamentos foram aplicados na face abaxial até antes do ponto de escorrimento no 3º ou 4º par de trifólio das plantas de soja. A inoculação por aspersão de uma suspensão na concentração de 10⁶ uredosporos.mL⁻¹ foi realizada 24 horas após aplicação dos tratamentos e as plantas foram mantidas por 48 horas no escuro em câmara úmida. As plantas de soja foram mantidas em uma câmara a 22°C e com fotoperíodo de 12 horas. As variáveis resposta obtidas foram:

1) Período Latente (PL): a avaliação corresponde ao período compreendido da inoculação até a observação da primeira lesão com esporos.

2) Número de pústulas por cm² (pústulas/cm²): valor médio correspondente a observação aleatória do número de pústulas em 5 regiões de 1 cm² de cada folíolo da unidade amostral.

3) Eficiência de Controle Relativa (ECR): calculada a partir da “n”-ésima observação da variável pústulas/cm² pela equação: $ECR = \left(\frac{Y_{m\ c} - Y_{if}}{Y_{m\ c}} \right) * 100$, onde:

$Y_{m\ c}$ = Valor médio do controle negativo

Y_{if} = Valor obtido para variável pústula/cm² na “n”-ésima observação.

4) Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD): Calculada a partir da integralização dos valores de pústulas/cm² pela equação: $AACPD = (\sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] [t_{i+1} - t_1]) / \Delta t$ em que:

n = número de observações.

Δt = período de avaliação da doença.

Y_i = índice de pústulas por cm^2 na “ i ”-ésima observação.

t_i = tempo da “ i ”-ésima observação, em dias.

2.4 Análise estatística

Para o experimento de sensibilidade de *P. pachyrhizi* aos compostos, os dados obtidos foram transformados em $\log(x)$ e em seguida submetidos a análise de regressão logística. A variável referente a concentração inibitória de 90% dos uredosporos (IC_{90}) foi estimada para cada composto. Para os experimentos visando a obtenção das variáveis PL, pústulas/ cm^2 , AACPD e ECR os dados foram submetidos a análise de variância e o agrupamento das médias foi realizado pelo teste de Scott-Knott. Todas as análises foram feitas no software R (R Core Team 2013) usando os pacotes; readr, readxl, plyr, dplyr, drc, stats e easyanova.

3. RESULTADOS

3.1 Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* aos ditiocarbimatos

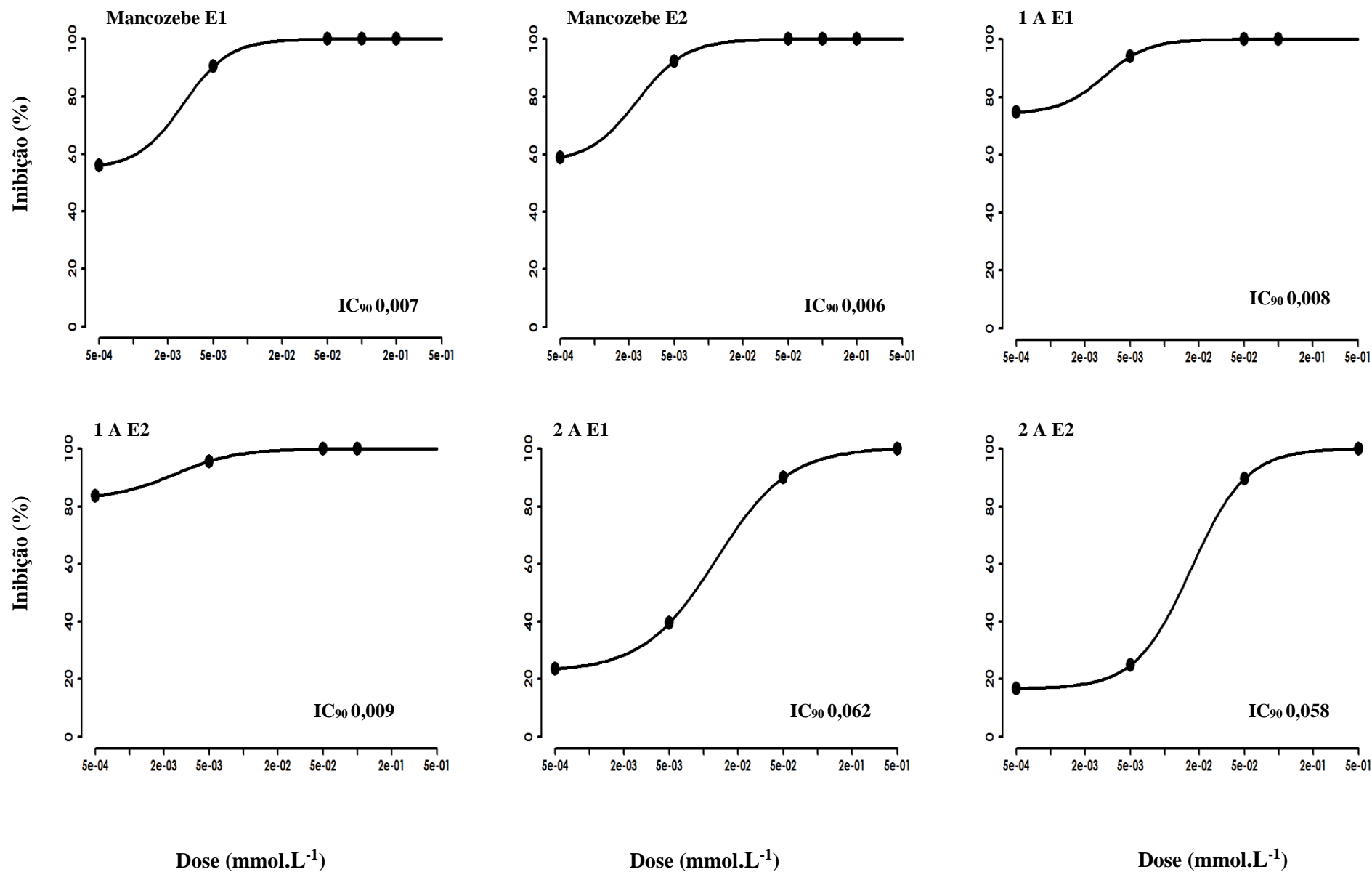
Os dados obtidos a partir da contagem dos esporos nas placas de Petri foram submetidos a análise de regressão logística e a variável IC_{90} foi estimada para cada composto (Tabela 1; Figura 1). Os menores valores de IC_{90} foram de 0,006 para o tratamento com a molécula 1B no experimento 1 e 0,006 para o mancozebe no experimento 2 (Tabela 1). Todos os compostos apresentaram efeitos inibitórios sobre o fungo. O menor valor de R^2 ajustado foi de 0,854 para 1B e o mais elevado foi 0,998 para 2A (Tabela 1). As doses mais baixas de mancozebe, 1A, 1B inibiram mais de 50% da germinação dos uredosporos (Tabela 1; Figura 1). A análise do $\text{IC}_{90\text{comb}}$ dos compostos demonstrou não haver diferença significativa entre os tratamentos 1A, 1B e 2B com controle padrão mancozebe (Tabela 1). O menor desempenho foi observado para 2A, que diferiu significativamente dos demais tratamentos.

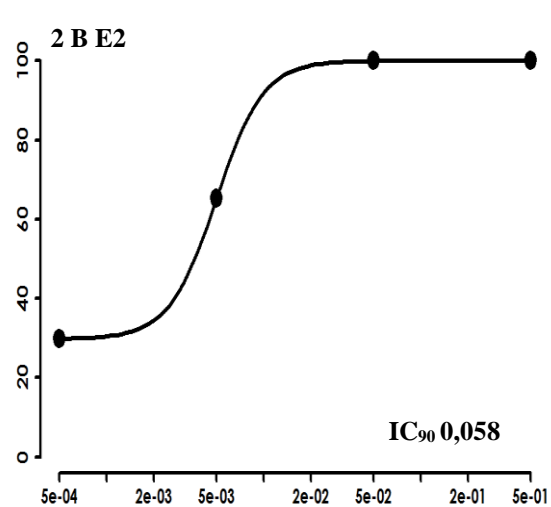
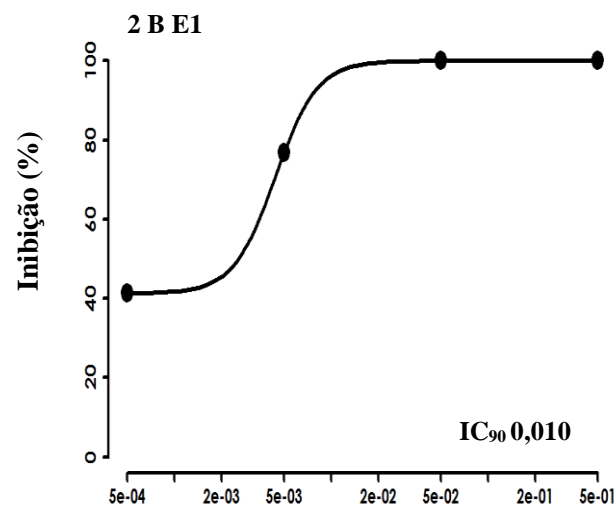
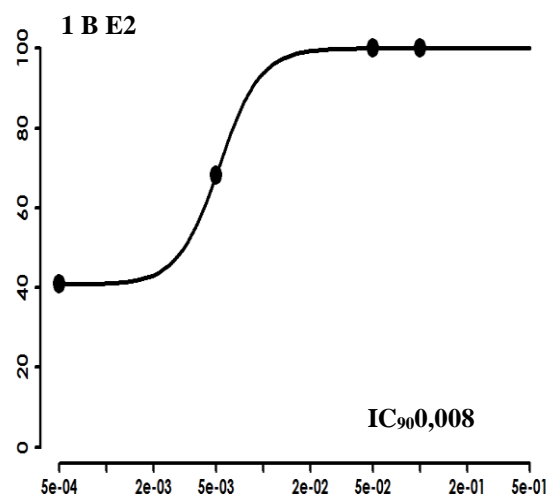
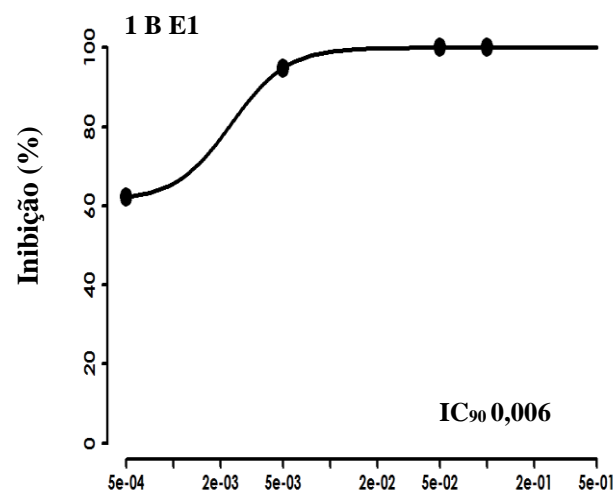
Tabela 1. Valores de IC₉₀ (mmol.L⁻¹) para *Phakopsora pachyrhizi* e modelo Logístico $f(y) = c \{d-c\} \{1^{\exp(b(\log(x)-\log(e)))}\}$.

Molécula	Experimento 1			Experimento 2			
	Parâmetros*	R ²	IC ₉₀	Parâmetros*	R ²	IC ₉₀	IC _{90 comb}
Mancozebe	b=-2,1; c=54,8; d=100,0; e=0,002	0,987	0,007	b=-2,0; c=57,0; d= 100,0; e=0,002	0,995	0,006	0,0065 b
1 A	b=-1,6; c=72,4; d=100,0; e=0,002	0,976	0,008	b=-1,5 c=81,9; d=100,0 e=0,002	0,994	0,009	0,0085 b
1 B	b=-2,1; c=60,3; d= 100,0; e=0,002	0,923	0,006	b=-2,1; c=60,3; d= 100,0; e=0,002	0,854	0,008	0,0070 b
2 A	b=-1,4 c=22,9; d= 100,0 e=0,012	0,998	0,062	b=-1,8 c=16,8; d= 100,0; e=0,017	0,969	0,058	0,0600 a
2 B	b=-2,8 c=41,2; d=100,0 e=0,004	0,936	0,010	b=-3,0 c=29,89; d= 100,0; e=0,004	0,893	0,009	0,0095 b

IC₉₀: Concentração inibitória de 90% do urepodosporos de *Phakopsora pachyrhizi*; IC_{90 comb}: Valores médios de IC₉₀ dos dois experimentos; R²: Coeficiente de determinação ajustado; (*): Parâmetros diferentes de 0 pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$). Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Figura 1. Curvas de da inibição da germinação dos uredoposros de *Phakopsora pachyrhizi* e IC_{90} . E1: Experimento 1; E2: Experimento 2.





Dose (mmol.L⁻¹)

Dose (mmol.L⁻¹)

3.2 Efeito dos ditiocarbimatos no controle da FAS em condições de casa-de-vegetação

Os tratamentos 1B e 2B não tiveram estimativas e não foram considerados nos resultados. Os dados dos tratamentos 1B e 2B foram prejudicados pela expressão de sintomas de fitotoxidez nos folíolos de soja após 24 horas da aplicação dos tratamentos na dose de $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Figura 2). Os tratamentos 1A, 2A e mancozebe não apresentaram danos aos folíolos da soja nas concentrações utilizadas.

O período latente (PL) para o controle com água foi de 9 dias. O aparecimento dos sinais foram mais tardios no tratamento 2A (média= 21 dias) e a estimativa para a molécula 1A foi de 12 dias. Não foi observado lesões para o mancozebe e o PL não foi estimado.

Para a variável pústulas por cm^2 (pústulas/ cm^2) o tratamento controle com água apresentou média de 12,20 pústulas/ cm^2 , diferindo significativamente dos demais tratamentos. O composto 1A apresentou 6,9 pústula/ cm^2 diferindo significativamente de todos os tratamentos tendo obtido o segundo maior índice de doença. A média para tratamento com a molécula 2A foi estimada em 0,85 pústulas/ cm^2 e para o mancozebe (0,00) e estes tratamentos não diferiram entre si (Figura 3).

Em relação à variável AACPD o tratamento controle com água apresentou o valor médio de 75,8 e diferiu significativamente dos demais. A molécula 1A obteve a média estimada em 43,50 e apresentou diferença significativa para os tratamentos 2A (4,16) e mancozebe (0,00). A molécula 2A e o mancozebe não diferiram significativamente entre si (Figura 3).

O tratamento com o produto químico 1A com 42,69 % de pústula/ cm^2 teve a mais baixa eficiência relativa de controle. Este tratamento diferiu significativamente dos tratamentos com o produto químico 2A (92,99 %) e mancozebe (100%) no controle da doença, respectivamente. A molécula 2A e o mancozebe não diferiram significativamente entre si (Figura 3).

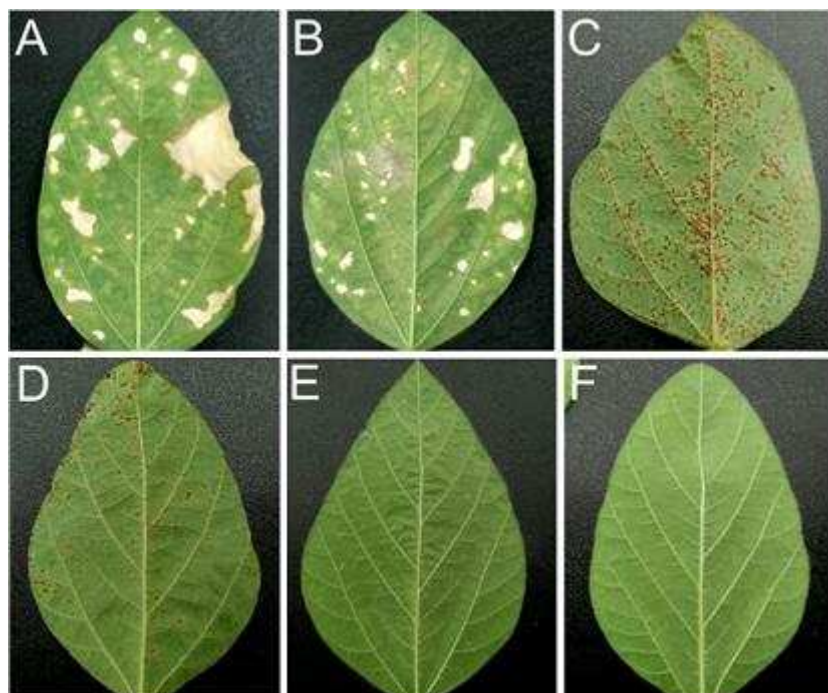


Figura 2. Resultados do efeito da aplicação das moléculas nas doses de $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ no controle da FAS. A: composto químico 1B; B: composto químico 2B; C: Controle positivo (H_2O); D: composto químico 1A; E: composto químico 2A; F: Controle positivo (mancozebe).

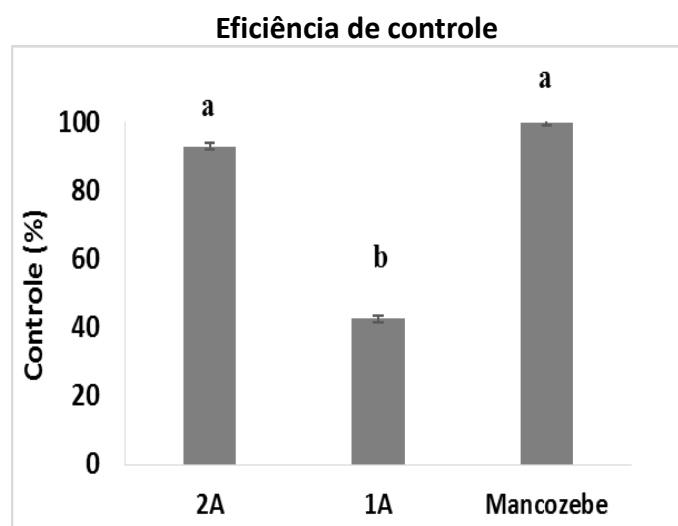
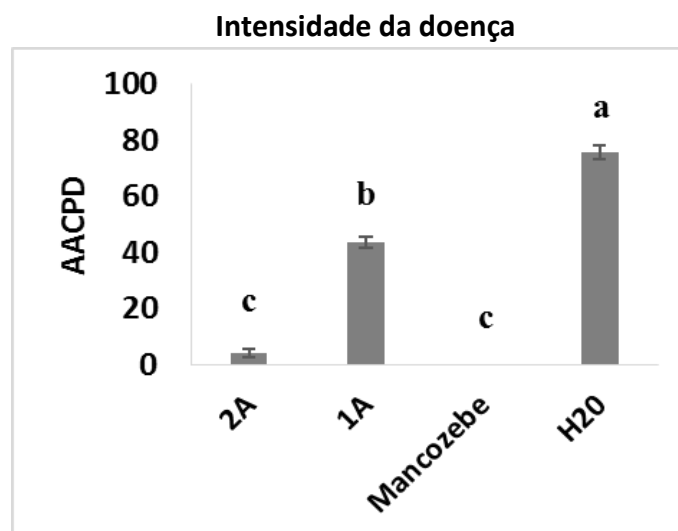
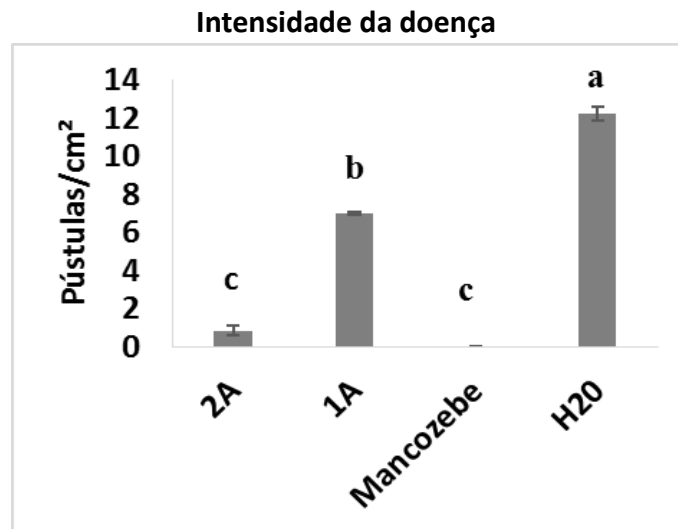


Figura 3. Efeito dos ditiocarbimatos sobre a intensidade FC em mudas de soja. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1 Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* aos ditiocarbimatos

Os testes de sensibilidade evidenciaram o potencial das moléculas dos ditiocarbimatos para o controle de *P. pachyrhizi* (Tabela 1). Verificou-se que o aumento da concentração dos ditiocarbimatos ocasionou maior efeito inibitório no fungo (Figura 1). Houve forte associação entre o incremento da dose e o aumento da inibição da germinação, demonstrados pelos valores de R^2 superiores a 0,854 para todos os compostos.

A análise dos valores de IC_{90comb} demonstrou a capacidade das moléculas dos ditiocarbimatos 1A, 1B e 2B inibirem a esporulação de *P. pachyrhizi* similar ao controle padrão mancozebe. O tratamento com a molécula 2A diferiu dos demais tratamentos e foi o menos ativo. Entretanto, houve 100% de inibição dos esporos a partir da dose 0.1 mmol.L^{-1} . A variação de desempenho apresentada pelos ditiocarbimatos podem ser explicados pela ação fungitóxica na germinação dos esporos. Fatores fisiológicos e genéticos que podem influenciar a capacidade do fungo responder aos estresses causados por fungicidas (Kretschmer *et al.*, 2009).

Reduzir a esporulação do fitopatógeno é uma característica muito importante para fungicidas multi-sítios protetores, uma vez que estará afetando o ciclo reprodutivo do fungo e contribuindo para o reduzir a pressão de seleção em fungos ao mitigar a frequência de mutações em *P. pachyrhizi* (Klosowski *et al.*, 2016).

4.2 Efeito dos ditiocarbimatos no controle da FAS em condições de casa-de-vegetação

Os resultados promissores das moléculas do grupo dos ditiocarbimatos 1A, 1B, 2B e 2A nos testes de inibição da germinação *in vitro*, possibilitaram desdobramentos para a realização de estudos sobre o comportamento do grupo ditiocarbimato, no controle da FAS, em testes *in vivo*, sob condições controladas, em casa-de-vegetação. Para tal, foram delineados experimentos, para obtenção das variáveis referentes a eficiência de controle: PL, pústulas/cm², ECR e AACPD. Os resultados mostraram que o composto 2A apresentou grande potencial no controle da FAS com eficácia similar, ao tratamento controle positivo mancozebe. O tratamento 2A apresentou alto valor de PL e menor número de pústulas/cm² e AACPD demonstrando que os ditiocarbimatos podem reduzir o número dos ciclos de

infecções da doença e consequentemente apresentam grande potencial no controle (Leclerc *et al.*, 2014). O próximo passo, será avaliá-los em condições de campo, visando estudar o tempo de degradação na superfície foliar e o efeito protetor contra FAS.

Nos experimentos *in vivo*, observou-se fitotoxidez para os tratamentos com as moléculas 1B e 2B. Entretanto, não houveram anomalias visíveis nos tecidos foliares submetidos aos tratamentos com as moléculas 1A e 2A. A principal diferença estrutural entre os dois grupos consiste na presença de contra-íons diferentes. O grupo A apresenta o tetrafenilfosfônio e, o grupo B, possui o tetrabutilamônio. O caminho a ser investigado, para a provável explicação da ausência de fitotoxidez no grupo A e, fitotoxidez no grupo B, é estudar a degradação dos compostos e a liberação do íon amônio. As células vegetais, tem a capacidade de absorver o íon amônio de forma passiva. Porém, se os níveis de absorção forem maiores que os de metabolização pode ocorrer a intoxicação dos tecidos foliares (Barker, 1999).

O amônio pode causar colapso em processos relacionados a fotossíntese, síntese de ATP e na cadeia transportadora de elétrons (Opanasenko *et al.*, 2009). Vale ressaltar ainda que, espécies de nitrogênio em plantas, como o amônio, está ligado a danos foliares e no incremento da eficácia de herbicidas (Carvalho *et al.*, 2011).

Os resultados das variáveis PL, pústulas/cm², ECR e AACPD para o experimento *in vivo*, demonstrou que o tratamento com a molécula 1A não foi eficiente para controlar a FAS. As moléculas 2A e o mancozebe foram eficientes e não diferiram significativamente entre si. Entretanto em doses maiores da molécula 1A, é possível que haja aumento de sua eficiência. No presente trabalho as moléculas dos ditiocarbimatos foram empregadas em razão molar para padronizar o número de moléculas em cada tratamento. Assim, a concentração molar (0,05 mmol.L⁻¹) de cada molécula utilizada no experimento para variáveis epidemiológicas equivale a uma redução de 175 vezes em relação a recomendação de 3,75 quilos gramas do ingrediente ativo mancozebe por hectare.

Outra hipótese que pode explicar essa diferença de controle pode estar relacionada com a composição estrutural das moléculas. A principal diferença estrutural entre os tratamentos com as moléculas 1A e 2A consiste na presença do grupo metila na molécula 2A, e presença do 4-clorofenila na molécula 1A. A priori,

essas diferenças estruturais podem mudar aspectos físicos que influenciam a dispersão em água.

Compreender a dispersão e solubilidade em meio aquoso pode ajudar a entender a diferença de controle entre as moléculas 1A e 2A. O preparo da calda é um ponto crítico e a solubilidade em água pode afetar a homogeneidade da dispersão dos compostos em meio aquoso. A natureza hidrofóbica dos compostos, permite maior interação com estruturas lipídicas presentes na superfície das folhas das plantas e conseqüentemente, pode ter ocorrido diferenças na adesão dos compostos na superfície foliar (Hunsche *et al.*, 2006).

Outra hipótese relevante é que diferenças na hidrofobicidade dos complexos lipofílicos orgânicos podem permitir níveis distintos de interações com regiões lipofílicas das células fúngicas ou dos vegetais, principalmente compostos com cadeias alifáticas ou aromáticas nas extremidades. Estas características sugerem possíveis diferenças dos compostos, ao interagir com a bicamada lipídica da membrana plasmática, camada de cera, epiderme e cutícula (Pinney *et al.*, 1997). A existência de tais diferenças, poderiam influenciar a capacidade dos compostos ou inibir a germinação dos uredosporos na superfície foliar.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as moléculas do grupo A (1A e 2A) têm potencial para controle da ferrugem-asiática-da-soja. A molécula 2A tem grande potencial por apresentar controle similar ao produto padrão mancozebe.

6. REFERÊNCIAS

- Barker A V. (1999) Foliar ammonium accumulation an index of stress in plants. *Commun Soil Sci Plant Anal* 30:167–174. doi: 10.1080/00103629909370193.
- Bottega FC, Oliveira MRL, Garcia CV, Menezes DC (2013) Syntheses, characterization and antifungal activity of tris(1,10-phenanthroline) iron(ii) bis(n-r-sulfonyldithiocarbamate)zincate(ii) *Quim. Nova* 36:803–807. doi: 36:803–807.

- Carvalho P, Jorge SFT, Carvalho P, Dias R, Carolina A e Jacob P (2011) Participação do nitrogênio na indução de injúrias foliares e na eficácia do herbicida glyphosate. *Rev Ceres* 58:516–524.
- Godoy CV, Utiamada CM, Meyer MC, Campos HD, Forcelini CA, Pimenta CB, Filho DSJ (2016) Eficiência de fungicidas multissítios no controle da ferrugem-asiática-da-soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos Embrapa 1-7.
- Hunsche M, Bringe K, Eiberge MS and Noga G (2006) Leaf surface characteristics of apple seedlings, bean seedlings and kohlrabi plants and their impact on the retention and rainfastness of mancozeb *Pest Management Science* 62:839–847.
- Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A, Walker A, Fillinger S, Mernke D, Schoonbeek H, Pradier J, Leroux P, Waard M and Hahn M (2009) Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. doi: 10.1371/journal.ppat.1000696.
- Klosowski AC, Brahm L, Gerd S and Mio LLMM (2016) Competitive Fitness of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates with Mutations in the CYP51 and CYTB Genes *Phytopatology* 106: 1278-1284. doi: 10.1094/PHYTO-01-16-0008-R
- Leclerc M, Doré T, Gilligan CA, Lucas P, Filipe J A N (2014) Estimating the delay between host infection and disease (incubation period) and assessing its significance to the epidemiology of plant diseases. *PLoS One* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0086568.
- Oliveira AA, Oliveira MRL, Rubinger MMM, Pilóa EL, Meneses DC and Zambolim L (2015) Bis(4-fluorophenylsulfonyldithiocarbimato) zincate(ii) salts: new antifungals for the control of *Botrytis* blight *Quimica Nova* 757-761 doi.org/10.5935/0100-4042.20150075.
- Opanasenko VK, Vasyukhina LA (2009) Synergism of ammonium and palmitic acid in uncoupling of electron transfer and ATP synthesis in chloroplasts. *Biochemical* 74:643–647. doi: 10.1134/S000629790906008X.

- Pinney J, Ruland K (1997) Trace metal exchange in solution by the fungicides ziram and maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells. 16:2046–2053.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Schmitz HK, Medeiros CA, Craig IR, Stammler G (2014) Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Management Science* 70:378–388. doi: 10.1002/ps.3562.
- Simões K, Hawlik A, Rehfus A, Gava F and Stammler G (2018) First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *J Plant Dis Prot* 125:21–26. doi: 10.1007/s41348-017-0117-5.
- Twizeyimana M, Hartman GL (2017) Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates to fungicides and reduction of fungal infection based on fungicide and timing of application. *Plant Diseases* 101:121–128. doi: 10.1094/PDIS-04-16-0552-RE.
- Xavier SA, Koga LJ, Barros DCM, Canteri MG, Lopes ION and Godoy CV (2015) Variação da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da desmetilação no Brasil. *Summa Phytopathologica* 41:191–196. doi: 10.1590/0100-5405/2068.
- Yorinori JT, Paiva WM, Frederick RD, Costamilan LM, Bertagnolli PF, Hartman GE, Godoy CV, Nunes J (2005) Epidemics of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003 *J. Plant Diseases* 89:675–677. doi: 10.1094/PD-89-0675.