

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALEXANDRE CLAUS

PENALIDADES ADAPTATIVAS ASSOCIADAS A MUTAÇÃO *Sdhc-I86F* EM
Phakopsora pachyrhizi E INIBIÇÃO DO OÍDIO E DA FERRUGEM ASIÁTICA COM
HERBICIDAS EM SOJA

CURITIBA

2022

ALEXANDRE CLAUS

PENALIDADES ADAPTATIVAS ASSOCIADAS A MUTAÇÃO *SdhC*-I86F EM
Phakopsora pachyrhizi E INIBIÇÃO DO OÍDIO E DA FERRUGEM ASIÁTICA COM
HERBICIDAS EM SOJA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Louise Larissa May De Mio.

CURITIBA

2022

Claus, Alexandre

Penalidades adaptativas associadas a mutação SdhC-I86F em *Phakopsora pachyrhizi* e inibição do oídio e da ferrugem asiática com herbicidas em soja. - Curitiba, 2022.

125f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Louise Larissa May De Mio

1. Soja - cultivo. 2. Herbicidas. 3. *Phakopsora pachyrhizi*.

I. Mio, Louise Larissa May De. II. Título III. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ALEXANDRE CLAUS** intitulada: **PENALIDADES ADAPTATIVAS ASSOCIADAS A MUTAÇÃO SdhC-I86F EM *Phakopsora pachyrhizi* E INIBIÇÃO DO OÍDIO E DA FERRUGEM ASIÁTICA COM HERBICIDAS EM SOJA**, sob orientação da Profa. Dra. LOUISE LARISSA MAY-DE-MIO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

01/02/2022 15:22:45.0

LOUISE LARISSA MAY-DE-MIO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/02/2022 12:14:27.0

WAGNER VICENTE PEREIRA

Avaliador Externo (AGRONÔMICA)

Assinatura Eletrônica

01/02/2022 12:22:44.0

ANA CLAUDIA KLOSOWSKI

Avaliador Externo (BAYER)

Assinatura Eletrônica

01/02/2022 12:10:12.0

ARTHUR ARROBAS MARTINS BARROSO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/02/2022 12:17:01.0

KELLY SIMÕES

Avaliador Externo (BASF S.A, ESTAÇÃO EXPERIMENTAL AGRÍCOLA)

Rua dos Funcionários, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80035-050 - Tel: (41) 3350-5601 - E-mail: pgapv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 143889

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 143889

Dedico esta tese aos meus pais Daniel e Ines, como reconhecimento por toda dedicação e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado à dádiva de existir, saúde, paz e conforto nas adversidades enfrentadas.

À minha família, meu alicerce que amo muito, em especial meus pais Daniel e Ines pelo amor, apoio imensurável, lutarem sempre para possibilitar o meu melhor, sendo exemplo de pessoas para mim.

À minha esposa Adenise, pelo amor incondicional e por ser tão especial, companheira e cúmplice dessa trajetória, e sempre torcer pelas minhas conquistas.

Aos irmãos Carlos e Juliana, sobrinhos Arthur, Miguel e Carolina, e ao que está a caminho.

À minha orientadora, Dra. Louise Larissa May De Mio, por confiar e me acolher desde o primeiro contato para ser seu orientado, sendo um exemplo de profissional, não medindo esforços ao transmitir seu conhecimento com dedicação, respeito, companheirismo e muito amor a pesquisa.

Ao professor Dr. Arthur Arrobas Martins Barroso, pela parceria em meus trabalhos, pelos ensinamentos e orientações repassadas com muito profissionalismo e respeito, sempre disposto a ajudar, por possibilitar ampliar meu conhecimento em relação a outras áreas.

À pesquisadora da BASF Kelly Simões, pela dedicação ao me receber e dar todo suporte necessário na realização de parte de minha pesquisa, por repassar seu conhecimento com propriedade, paciência e de forma super didática, contribuindo com meu aprendizado. Agradeço também toda sua equipe, o pesquisador Fernando Gava pela disponibilidade e, as técnicas Karém e Fernanda pelo auxílio.

Ao time da soja, aos estagiários Guilherme, Luiz, Letícia, Francieli, Isabel e a pós-graduanda Érica, pelo comprometimento e dedicação. As egressas Ana e Mônica que iniciaram a caminhada com a soja no laboratório, e deixaram suas contribuições.

Meu agradecimento ao Marlon, pela amizade e auxílio em algumas análises estatísticas, sempre disposto a colaborar.

Aos colegas e amigos do laboratório Lemid, Marlon, Thiago, Gabriel, Wagner, Jhulia, Camila, Heloisa, Mônica, Rafaele, Eliane, Érica, Débora, Brenda, Juliana, Giovana, Daniele, Fernando, Pamela, Maria Gabriela, Julyara, Livia, Carolina, Amanda, Meira e Renan pela amizade, companheirismo, momentos de descontração

e presença durante esta etapa. Aos colegas da matologia, Eduardo, Bruna e Samia, sempre dispostos a contribuir.

Aos demais amigos pelos momentos presentes, fazendo o dia-a-dia mais leve, por se preocuparem comigo.

Aos membros da minha qualificação e pré-defesa, Dr. Luis Klososki, Dra. Kelly Simões, Dr. Arthur Arrobas Martins Barroso e Dr. Wagner Vicente, pelas contribuições apresentadas.

Aos membros da Banca Avaliadora da defesa, Dra. Kelly Simões, Dra. Ana Claudia Klosowski, Dr. Wagner Vicente Pereira, Dr. Arthur Arrobas Martins Barroso, agradeço por terem aceito participar deste momento, e pelas contribuições, o meu muito obrigado.

Ao Instituto Federal Catarinense, pela concessão do afastamento integral para realização do doutorado. Aos alunos, servidores e terceirizados, principalmente aos colegas da Agronomia do campus Concórdia/SC, e na lembrança do professor Dr. Juares Ogliari (*in memoriam*).

À Univesidade Federal do Paraná, sempre presente desde minha graduação. Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal - UFPR, docentes e técnicos envolvidos, em especial aos professores Dr. Henrique e Dr. Álvaro, aos técnicos Maria Emília, Lucimara, Isabel, Simone e Tiago. E não poderia deixar de mencionar seu Antônio, porteiro.

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

A todos que de uma forma ou outra contribuíram e torcem por mim.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas, ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

A cultura da soja é de grande importância mundial, e dentre os fatores que afetam a sua produtividade, as perdas causadas por doenças e plantas daninhas merecem cada vez mais atenção. Os objetivos deste estudo foram investigar a estabilidade e componentes de adaptabilidade associados à mutação *SdhC*-I86F do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja; estudar se aplicações de herbicida em doses recomendadas em bula para controle de plantas daninhas em soja com tripla tolerância a herbicidas se relacionam com a redução das doenças: oídio e ferrugem asiática da soja. As frequências do alelo *SdhC*-I86F foram estáveis pelo período de até 36 gerações do fungo na ausência de pressão de seleção. A população suscetível - WT_{*SdhC*} em apenas uma geração na presença de fungicida SDHI, apresentou o alelo mutado - *SdhC*-I86F. Populações mutadas apresentaram hipersensibilidade ao estresse osmótico e oxidativo, indicando a presença de penalidades adaptativas associadas à mutação. As populações *SdhC*-I86F foram menos sensíveis que a WT_{*SdhC*} para o fungicida azoxistrobina+benzovindiflupir, e mais sensíveis ao mancozebe, destacando uma possibilidade de resistência cruzada negativa. A presença da estabilidade e penalidades adaptativas, e a maior sensibilidade ao mancozebe das populações *SdhC*-I86F podem ser características relevantes para manejo desta doença a campo. Os herbicidas glifosato, glufosinato de amônio, 2,4-D e glifosato+2,4-D foram aplicados em soja tolerante e a severidade de oídio – *Erysiphe diffusa* foi avaliada. Os herbicidas glifosato+2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio reduziram a severidade em 88,28, 74,06, 64,41%, respectivamente. Devido a isso, estes herbicidas apresentam potencial para inibir o oídio da soja. Para avaliar a atividade inibitória de herbicidas para a ferrugem asiática – *P. pachyrhizi* em soja tolerante, foram utilizados o glifosato, 2,4-D e glifosato+2,4-D. O glifosato e glifosato+2,4-D apresentaram atividade de inibição preventiva e curativa, reduziram a severidade da ferrugem e a produção de esporos do fungo. O glifosato+2,4-D apresentou sinergismo na inibição da ferrugem e do oídio na soja. O 2,4-D não apresentou atividade inibitória e não causou aumento da severidade para ambas as doenças. Existe a possibilidade de novos cenários relacionados ao manejo da ferrugem asiática e do oídio da soja, principalmente em culturas transgênicas. Este trabalho traz avanços no entendimento do impacto da mutação *SdhC*-I86F e, é pioneiro ao estudar soja com tripla tolerância na relação herbicida x patógeno x hospedeiro e novas metodologias.

Palavras-chave: *SdhC*-I86F. *Fitness*. *Erysiphe diffusa*. *Phakopsora pachyrhizi*. *Aad-12*. *2mepsps*. *Pat* gene. Enlist®. Glifosato. Glufosinato. 2,4-D.

ABSTRACT

The soybean crop is of great importance worldwide, and among the factors that affect its productivity, the losses caused by diseases and weeds require more and more attention. The objectives of this study were to investigate the stability and fitness penalties associated with the *SdhC*-I86F mutation of the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, which causes asian soybean rust; to study whether herbicide applications at labeling doses for weed control in soybean with triple herbicide tolerance are related to disease reduction: powdery mildew and asian soybean rust. The frequencies of the *SdhC*-I86F allele were stable for up to 36 generations of the fungus in the absence of selection pressure. The susceptible population - WT_{*SdhC*} in only one generation in the presence of SDHI fungicide, presented the mutated allele - *SdhC*-I86F. Mutated populations showed hypersensitivity to osmotic and oxidative stress, indicating the presence of fitness penalties associated with the mutation. The *SdhC*-I86F populations were less sensitive than WT_{*SdhC*} to the fungicide azoxystrobin+benzovindiflupyr, and more sensitive to mancozeb, highlighting a possibility of negative cross-resistance. The presence of stability and fitness penalties, and the greater sensitivity to mancozeb of the *SdhC*-I86F populations may be relevant characteristics for the management of this disease in the field. The herbicides glyphosate, ammonium glufosinate, 2,4-D and glyphosate+2,4-D were applied to soybean herbicide-tolerant and the severity of powdery mildew – *Erysiphe diffusa* was evaluated. The herbicides glyphosate+2,4-D, glyphosate and ammonium glufosinate reduced severity by 88.28, 74.06, 64.41%, respectively. Because of this, these herbicides have the potential to inhibit soybean powdery mildew in soybean herbicide-tolerant. To evaluate the inhibitory activity of herbicides against asian soybean rust – *P. pachyrhizi* in soybean herbicide-tolerant, glyphosate, 2,4-D and glyphosate+2,4-D were applied. Glyphosate and glyphosate+2,4-D showed preventive and curative inhibition activity, reduced rust severity and fungus spore production. Glyphosate+2,4-D showed synergism in inhibiting asian rust and soybean powdery mildew. 2,4-D showed no inhibitory activity and did not cause an increase in severity for both diseases. There is the possibility of new scenarios related to the management of asian rust and soybean powdery mildew, especially in transgenic crops. This work brings advances in the understanding of the impact of the *SdhC*-I86F mutation and is a pioneer in studying soybean with triple tolerance in the herbicide x pathogen x host relationship and new methodologies.

Key-words: *SdhC*-I86F. Fitness. *Erysiphe diffusa*. *Phakopsora pachyrhizi*. AaD-12. 2mepsps. *Pat* gene. Enlist®. Glyphosate. Glufosinate. 2,4-D.

LISTA DE FIGURAS

II Capítulo 1 - *SdhC*-I86F mutation in *Phakopsora pachyrhizi* is stable and can be related to fitness penalties

Figure 1. Origin of *Phakopsora pachyrhizi* populations in Brazil map. Leaves samples were collected of soybean plants infected with Asian soybean rust during the 2017/2018 soybean seasons. Brazilian States: BA - Bahia and PR - Paraná. Municipalities: BA - Luís Eduardo Magalhães; PR - Campo Magro, Palmeira, Palotina, and Ponta Grossa.....53

Supplementary Figure S1. Maps of the climatological conditions of Brazil. Temperature (A), Irradiation (B), and Precipitation (C). Names on the map are of the municipalities where the *Phakopsora pachyrhizi* populations were collected.....54

Supplementary Figure S2. Illustration of the main results from the fungicide sensitivity, molecular characterization and fitness assays.....55

Supplementary Figure S3. Illustration of the main results from the fungicide sensitivity, molecular characterization and fitness assays.....56

III Capítulo 2 - Potencial do uso de herbicidas para o controle de oídio em soja transgênica

Figura 1. Curvas do progresso da severidade do oídio na soja (média dos ensaios 4, 5 e 6), Curitiba-PR 20/21. Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Glu (glufosinato de amônio, Finale®, Basf); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva); PC (controle positivo, trifloxistrobina + tebuconazol, Nativo®, Bayer).....87

Figura 2. Efeito dos tratamentos preventivos com herbicidas no controle de oídio da soja em casa de vegetação (maio – agosto/2021), Curitiba-PR. Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Glu (glufosinato de amônio, Finale®, BASF); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Duo® Colex-D®, Corteva); PC (controle positivo, trifloxistrobina + tebuconazol, Nativo®, Bayer). Tratamentos aplicados em estágio V1 da soja - completo desenvolvimento das folhas unifolioladas.....88

Figura S1. Temperaturas mínima, média e máxima mensais de Curitiba/PR. **A** – Ano de 2020. **B** – Ano de 2021.....89

Figura S2. Curvas do progresso da severidade do oídio na soja cultivada em casa de vegetação em Curitiba/PR, 2020/2021. **A** - Ensaio 4, conduzido de agosto a outubro/2020; **B** – ensaio 5 (outubro a dezembro/2020); **C** - ensaio 6 (março a maio/2021). Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Glu (glufosinato de amônio, Finale®, BASF); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva); PC (controle positivo, trifloxistrobina + tebuconazol, Nativo®, Bayer).....90

IV Capítulo 3 - Herbicidas reduzem a severidade e esporulação de *Phakopsora pachyrhizi* em soja com tripla tolerância a herbicidas

Figura 1. Curvas acumulada da produção de esporos de *P. pachyrhizi* por tratamento ao longo dos dias de coleta de folíolos do terceiro trifólio de plantas de soja cultivadas em vaso em câmara de crescimento. **A** – Tratamentos preventivos realizados 1 dia antes da inoculação - experimento 1; **B** - Tratamentos curativos realizados 1 dia após a inoculação - experimento 1; **C** - Tratamentos preventivos realizados 1 dia antes da inoculação - experimento 2; **D** - Tratamentos curativos realizados 1 dia após a inoculação - experimento 2. Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Gly (glifosato sal

dimetilamina, Glizmax Prime[®], Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo[®] Colex-D[®], Corteva).....118

Figura S1. Ilustração resumida de cada etapa das metodologias *in vitro* e em folha destacada. Ensaio em folha destacada com tratamentos realizados de forma preventiva e curativa por meio da imersão das folhas em calda; e com tratamentos pulverizados de forma preventiva em plantas de soja com equipamento do tipo CO₂.....119

Figura S2. Ilustração resumida de cada etapa das metodologias *in vivo*. Ensaio com tratamentos realizados de forma preventiva e curativa por meio da pulverização de plantas de soja com equipamento do tipo CO₂.....119

Figura S3. Fotos do ensaio em folha destacadas após 15 dias da inoculação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Tratamentos curativos realizados por meio da imersão das folhas em calda 5 dias após a inoculação - DAI. **A** - NC (controle negativo - água). **B** - Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime[®], Corteva). **C** - 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D[®], Corteva); **D** - Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo[®] Colex-D[®], Corteva).....120

Figura S4. Plantas do ensaio *in vivo* (experimento 2) após 15 dias da inoculação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Tratamentos realizados por meio da pulverização das plantas com equipamento do tipo CO₂. **A** - NC (controle negativo - água). **B** - Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime[®], Corteva). **C** - 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D[®], Corteva); **D** - Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo[®] Colex-D[®], Corteva).....120

LISTA DE TABELAS

II Capítulo 1 - *SdhC*-I86F mutation in *Phakopsora pachyrhizi* is stable and can be related to fitness penalties

Table 1. *Phakopsora pachyrhizi* populations used and information regarding collection and mutations in the demethylase genes of cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*), and succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*).....47

Table 2. Frequency of *SdhC*-I86F analyzed in leaves from untreated leaves and treated with different concentrations of azoxystrobin + benzovindiflupyr.....48

Table 3. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* populations with different mutations in the demethylase genes cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*), and succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*) to azoxystrobin (quinone outside inhibitors-Qol) + benzovindiflupyr (succinate dehydrogenase inhibitor-SDHI), and the multi-site mancozeb in a detached leaf assay 49

Table 4. Effect of NaCl on spore germination of *Phakopsora pachyrhizi* populations with different mutations in the demethylase genes cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*), succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*) 50

Table 5. Effect of paraquat on spore germination of *Phakopsora pachyrhizi* populations with different mutations in the demethylase genes cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*) and succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*).....51

Table 6. Effect of UV radiation on spore germination of *Phakopsora pachyrhizi* populations with different mutations in the demethylase genes cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*) and succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*) 52

Supplementary Table S1. Chemical treatments with commercial fungicides carried out in the field areas where the populations were collected and number of sprays	58
--	----

Supplementary Table S2. Oligonucleotide primers used for sequencing the <i>Sdh</i> subunit C, <i>Cytb</i> and <i>Cyp51</i> genes of <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	59
---	----

III Capítulo 2 - Potencial do uso de herbicidas para o controle de oídio em soja transgênica

Tabela 1. Médias de severidade de oídio na soja aos 15 e 30 dias após a aplicação (DAA), nos ensaios 1 e 2; e, área abaixo da curva do progresso da severidade, ensaio 3, Curitiba-PR, 2020.....	86
---	----

Tabela 2. Área abaixo da curva do progresso da severidade de oídio na soja, comparando tratamentos com herbicidas, em 3 experimentos realizados em casa de vegetação, Curitiba-PR, 2020/2021.	86
---	----

IV Capítulo 3 - Herbicidas reduzem a severidade e esporulação de *Phakopsora pachyrhizi* em soja com tripla tolerância a herbicidas

Tabela 1. Médias da severidade da ferrugem asiática da soja após tratamentos preventivos aplicados antes da inoculação, e curativos aplicados após a inoculação, com a imersão total de folíolos destacados em calda com tratamento e incubadas conforme metodologia de folha destacada.....	114
---	-----

Tabela 2. Médias da severidade da ferrugem asiática da soja após tratamentos preventivos realizados antes da inoculação, aplicados com equipamento do tipo CO ₂ e incubadas conforme metodologia de folha destacada.....	115
--	-----

Tabela 3. Médias da severidade da ferrugem asiática da soja após tratamentos curativos realizados após a inoculação, aplicados com a imersão total de folíolos destacados em calda com tratamento e incubadas conforme metodologia de folha destacada.....	116
---	-----

Tabela 4. Médias da severidade da ferrugem asiática da soja após tratamentos preventivos realizados antes da inoculação e curativos realizados após a inoculação, aplicados com equipamento do tipo CO₂ em plantas cultivadas em vaso, que foram mantidas *in vivo* em câmaras de crescimento até a avaliação da severidade.....117

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO GERAL.....	19
II Capítulo 1 - <i>SdhC</i>-I86F mutation in <i>Phakopsora pachyrhizi</i> is stable and can be related to fitness penalties	21
Abstract.....	21
1 INTRODUCTION.....	22
2 MATERIALS AND METHODS.....	25
2.1 Sampling <i>P. pachyrhizi</i> populations from the field and detached leaf assay	25
2.2 Molecular characterization of mutations in <i>Cyp51</i> , <i>Cytb</i> , and <i>SdhC</i> genes of <i>P. pachyrhizi</i> populations.....	26
2.2.1 First timepoint: molecular characterization of mutations of <i>P. pachyrhizi</i> populations from field collections.....	27
2.2.1.1 DNA extraction	27
2.2.1.2 Genetic analysis of the <i>Cyp51</i> and <i>Cytb</i> genes.....	28
2.2.1.3 Genetic analysis of the <i>SdhC</i> gene	28
2.2.2 Second timepoint: molecular characterization of mutations of <i>P. pachyrhizi</i> populations after 18 months (36 generations) in the absence of fungicides.....	29
2.2.3 Third timepoint: molecular characterization of mutations of <i>P. pachyrhizi</i> populations after a generation with fungicide	29
2.3 Fungicide sensitivity assay	30
2.4 Fitness Assays	31
2.4.1 Sensitivity to osmotic stress	31
2.4.2 Sensitivity to oxidative stress.....	32
2.4.3 Sensitivity to UV radiation.....	32
2.5 Statistical analysis	33
3 RESULTS.....	34

3.1 Molecular characterization of mutations of <i>P. pachyrhizi</i> populations from field collection - first timepoint.....	34
3.2 Molecular characterization of mutations of <i>P. pachyrhizi</i> populations after 18 months (36 generations) in the absence of fungicides - second timepoint.....	34
3.3 Molecular characterization of mutations of <i>P. pachyrhizi</i> populations after a generation with fungicide – third timepoint	35
3.4 Fungicide sensitivity test.....	35
3.5 Sensitivity to osmotic stress	36
3.6 Sensitivity to oxidative stress.....	36
3.7 Sensitivity to UV radiation.....	36
4 DISCUSSION	37
LITERATURE CITED	42
III Capítulo 2 - Potencial do uso de herbicidas para o controle de oídio em soja transgênica	61
Resumo	61
1 INTRODUÇÃO	62
2 MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 Cultivares e produtos	64
2.2 Descrição dos ensaios	65
2.3 Infecção com oídio	66
2.4 Aplicação foliar dos tratamentos	67
2.5 Avaliação da doença e análise estatística.....	68
3 RESULTADOS.....	69
3.1 Ensaios 1, 2 e 3.....	69
3.2 Ensaio 4, 5, 6 e 7	69
4 DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIAS.....	77

IV Capítulo 3 - Herbicidas reduzem a severidade e esporulação de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em soja com tripla tolerância a herbicidas	91
Resumo	91
1 INTRODUÇÃO	92
2 MATERIAL E MÉTODOS	94
2.1 Cultivares e herbicidas	94
2.2 Obtenção do inóculo e inoculações.....	95
2.3 Descrição dos ensaios	96
2.3.1 Ensaios <i>in vitro</i>	96
2.3.2 Ensaios em folha destacada	96
2.3.2.1 Ensaios preventivos - 1 DBI e curativo - 1 DAI (folha destacada)	97
2.3.2.2 Ensaios preventivos – DBI (folha destacada).....	97
2.3.2.3 Ensaios curativos – DAI (folha destacada).....	97
2.3.3 Ensaios preventivos - DBI (<i>in vivo</i>) e curativos – DAI (<i>in vivo</i>).....	98
2.4 Aplicação dos tratamentos com equipamento de pulverização de CO ₂	99
2.5 Delineamento e análises estatísticas	100
3 RESULTADOS.....	100
4 DISCUSSÃO	102
REFERÊNCIAS.....	108
V CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	121
REFERÊNCIAS GERAIS	122

I INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma das *commodities* mais importantes mundialmente, pois é fonte de óleo e proteína para alimentação humana e animal. É a maior fonte mundial de proteína e a segunda maior fonte de óleo vegetal (Song et al. 2021). A produção global de soja mais que dobrou desde 2000 e mais que quadruplicou desde 1980 (FAO, 2021). Cerca de 70% desse aumento da produção foi devido à expansão da área colhida e 30% pelo ganho de produtividade (Cassman & Grassini, 2020). O Brasil ocupa o primeiro lugar mundial em produção do grão, seguido dos Estados Unidos e Argentina. No país, os principais produtores são os estados do Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2021). As principais ameaças que limitam a produção da soja são doenças e plantas daninhas (Hartman et al. 2011).

Dentre as principais doenças, destacam-se a ferrugem asiática e o oídio, pela redução da produtividade e custo com controle. A ferrugem asiática da soja é considerada a doença mais devastadora da produção de soja no mundo (Kashiwa et al. 2020). É causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. (Tai, 1979; Savary et al. 2019). Esta doença pode causar uma redução de produtividade de até 90% (Yorinori et al. 2005; Godoy et al. 2016). Além das perdas, o custo de controle da ferrugem é elevado e, é maximizado devido a presença de mutações no fungo que conferem resistência a fungicidas (Schmitz et al. 2013; Klosowski et al. 2015; Simões et al. 2017; Müller et al. 2021; Claus et al. 2022). O oídio é uma doença causada pelo fungo biotrófico *Erysiphe diffusa* Cke. & Pk. (syn. *Microsphaera diffusa*) (Paxton & Rogers, 1974; Dunn & Gaynor, 2020). Essa doença foi considerada secundária na cultura da soja, mas nos últimos anos recebeu maior atenção devido as perdas observadas, que podem chegar em torno de 50% em função do estágio fenológico que infectar da cultura (Reis et al. 1997; Igaraski et al. 2010).

As plantas daninhas causam interferências na cultura que podem resultar em perdas de até 100%, caso não sejam utilizados métodos de controle eficientes (Chauhan, 2020). Devido o alto número de plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil e no mundo, esse problema é agravado (Gazziero et al. 2019; Chauhan, 2020; Barroso & Murata, 2021; Heap, 2021). Para minimizar o impacto de plantas daninhas resistentes na cultura da soja, foi desenvolvida a soja transgênica Enslit E3®,

que possui tripla tolerância a herbicidas. Essa tecnologia permite que sejam realizadas aplicações dos herbicidas glifosato, glufosinato e 2,4-D em pós emergência da cultura (CIB, 2021; ISAAA, 2021).

Essa tecnologia foi recentemente liberada no mundo, e no Brasil o seu cultivo comercial se iniciou na safra 2021/2022. É relatado que aplicações de herbicidas podem se relacionar com fitopatógenos, causando aumento ou redução na quantidade de doenças (Kortekamp, 2011; Sardrood & Goltapeh, 2018). Embora é bem descrito há muito tempo que os herbicidas podem impactar na ocorrência de doenças (Altman e Campbell 1977; Casale & Hart, 1986; Sanyal & Shrestha, 2008), esses efeitos são freqüentemente esquecidos porque os herbicidas são originalmente formulados e comercializados para controlar plantas daninhas, e não patógenos (Kao et al. 2019).

Com base no exposto, esta tese foi organizada em 3 capítulos que apresentam os seguintes objetivos: **Capítulo I** – caracterizar a genética de populações de *Phakopsora pachyrhizi* provenientes de campos de produção de soja do Brasil, quanto à presença e frequência de mutações nos genes (*Cyp51*, *Cytb* e *SdhC*); investigar se a mutação *SdhC*-I86F é estável após a propagação do fungo na ausência e presença de fungicida em mistura comercial azoxistrobina+benzovindiflupir (SDHI); avaliar a sensibilidade das populações aos fungicidas comerciais azoxistrobina+benzovindiflupir e mancozebe; avaliar componentes de adaptabilidade para populações com mutação *SdhC*-I86F. **Capítulo II** – investigar o efeito da aplicação foliar em doses recomendadas em bula para controle de plantas daninhas em soja tolerante aos herbicidas: glifosato dimetilamina, glufosinato de amônio, 2,4-D colina e a mistura comercial glifosato dimetilamina+2,4-D colina, na severidade de oídio; verificar se ocorre algum efeito aditivo, sinérgico ou antagônico com a mistura comercial glifosato+2,4-D na inibição desta doença; estudar a duração da inibição após a aplicação dos herbicidas. **Capítulo III** – estudar se o uso em dose recomendada em bula para controle de plantas daninhas dos herbicidas comerciais glifosato dimetilamina e 2,4-D colina e a sua mistura comercial, apresentam atividade de inibição da ferrugem asiática da soja – *P. pachyrhizi* quando aplicados em soja tolerante; analisar a ação preventiva e curativa dos tratamentos e, a duração da atividade inibitória e a sistemicidade do produto na planta de soja.

II CAPÍTULO 1 - *SDHC-I86F* MUTATION IN *Phakopsora pachyrhizi* IS STABLE AND CAN BE RELATED TO FITNESS PENALTIES¹

Alexandre Claus^{1,2}, Kelly Simões³ and Louise L. May De Mio^{2*}

¹Instituto Federal Catarinense, IFC. Rodovia SC 283 - km 17. CEP 89703-720, Concórdia, SC, Brazil.

²Universidade Federal do Paraná - UFPR, Rua dos Funcionários 1540, Curitiba 80035-050, Brazil.

³BASF S.A., Santo Antônio de Posse, Rua José Lopes s/n, Caixa Postal 42, 13833-612 Santo Antônio de Posse, Brazil.

***Corresponding author:** Louise L. May De Mio²; e-mail: maydemio@ufpr.br

The Authors declare no conflict of interest

Funding: This study was partially funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Abstract

Succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI) fungicides are used to control Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and the *SdhC*-I86F mutation is related to pathogen resistance. The objective of this study was to determine whether fitness penalties are associated with SDHI resistance (*SdhC*-I86F mutation) in *P. pachyrhizi* populations. Moreover, it investigated whether the *SdhC*-I86F mutation remained stable after the fungus propagation both in the absence and presence of fungicide.

¹ Capítulo preparado e aceito para publicação na revista *Phytopathology*®.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-21-0419-R>

The populations used in this study presented mutations for all genes analyzed (*Cyp51*, *Cytb*, and *SdhC*), except for a wild type population (WT_{*SdhC*}) found with no *SdhC*-I86F mutation. The frequencies of the *SdhC*-I86F mutant populations were stable after 36 generations in the absence of fungicide. However, in the case of the WT_{*SdhC*} population, the *SdhC*-I86F mutation was further detected after one generation of the fungus in the presence of the SDHI fungicide, according to the results of a detached leaf assay. Three tests were performed to evaluate fitness components and sensitivity to fungicides (EC₅₀). *SdhC*-I86F mutant populations were more sensitive to osmotic and oxidative stress than the WT_{*SdhC*} population; however, the sensitivity to UV radiation was similar for both populations. All mutated populations were less sensitive than the WT_{*SdhC*} when using SDHI (azoxystrobin + benzovindiflupyr), but more sensitive to mancozeb. The presence of fitness penalties, the mutation stability, and the sensitivity to mancozeb presented by the *SdhC*-I86F mutant populations can be relevant to the management of the disease in the field.

Keywords: Asian soybean rust; *Glycine max*; fungicide management; succinate dehydrogenase inhibitors

1 INTRODUCTION

Asian soybean rust (ASR), which is caused by the biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi* Syd. and P. Syd., is one of the main diseases in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] crops. This disease can cause significant yield losses worldwide (Godoy et al. 2016; Goellner et al. 2010; Yorinori et al. 2005). In Brazil, costs associated with ASR, including yield losses and disease control, are estimated at \$ 2.2 billion per soybean season (CAF 2020).

Although genetic and cultural control can reduce disease occurrence, fungicides are still essential to ASR management. The main fungicides registered for this purpose are the single-site ones, which are represented by demethylation inhibitors (DMI - FRAC 3), the "triazoles"; quinone outside inhibitors (QoI - FRAC 11), the "strobilurins"; succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI - FRAC 7), the "carboxamides"; and sterol biosynthesis inhibitors (FRAC 5), the "morpholines". In turn, recommended multi-site fungicides include mancozeb - dithiocarbamate (FRAC M3), copper oxychloride

(FRAC M05), and chlorothalonil (FRAC M01), which are used exclusively in commercial mixtures or tank-mixes with single-site fungicides (FRAC, 2021b).

Despite the efficacy of these products, failures in ASR control have been observed in different Brazilian regions due to the increasing presence of mutations in recent years. Monitoring the biotrophic pathogens' resistance to fungicides is difficult, especially in the case of rust species (Cook et al. 2021). Nevertheless, continual monitoring of ASR's resistance to fungicides has been conducted for 15 years in Brazil (FRAC, 2020) and has identified mutations related to reduced sensitivity.

Some of these mutations were found in the nuclear gene *Cyp51* (cytochrome P-450 14 α -sterol demethylase) both in samples collected during the 2009/2010 season in Brazil and one sample collected in 2004 in Taiwan. According to Schmitz et al. (2013), they affect the control efficiency of DMIs. There are five known non-synonymous mutations in the *Cyp51* gene associated with increased resistance levels (F120L, I145F, Y131H/F, K142R). These individual mutations are named by convention, which uses the WT amino acid letter code, codon position, and the mutated amino acid (F120L changes phenylalanine to leucine at codon 120; I145F changes isoleucine to phenylalanine at codon 145; I475T changes isoleucine to threonine at codon 475; Y131H/F changes tyrosine to histidine/phenylalanine at codon 131; K142R changes lysine to arginine at codon 142). In addition to these mutations, overexpression of the *Cyp51* gene was also detected by the same authors (Schmitz et al. 2013). Different combinations of mutations are denoted by a simplified naming scheme (M5, M6, M7). In this study, as suggested by Klosowski et al. (2016), the name M5 was used for combinations including F120L, I145F, and K142R; M6 for combinations including F120L, I145F, K142R, and Y131H; and M7 for combinations including I145F, K142R, and Y131H.

The mutation F129L of the mitochondrial *Cytb* gene (cytochrome b) was found in Brazilian samples from the 2013/2014 season. This mutation confers reduced sensitivity to QoIs due to the phenylalanine substitution for leucine at codon 129 (Klosowski et al. 2015). During the 2015/2016 season, the I86F mutation in the C subunit of the nuclear gene *Sdh* (succinate dehydrogenase) was also characterized in Brazilian samples. This mutation confers reduced sensitivity to SDHIs due to the isoleucine substitution for phenylalanine at codon 86 (Simões et al. 2017). It is worth

mentioning that SDHIs were registered for use on soybean crops in the 2013/2014 season (MAPA 2020), which demonstrates a rapid reduction in the fungus sensitivity to fungicides since the *SdhC*-I86F mutation was detected in the 2015/2016 season. Furthermore, the occurrence of multiple resistance due to mutations in the *Cyp51*, *Cytb*, and *SdhC* genes was described even in one monouredinal isolate (Müller et al. 2021).

Nevertheless, these mutations may not only reduce sensitivity to certain fungicides but also affect the efficiency of significant physiological and biochemical fungal processes. If this occurs, the mutation may cause fitness penalties that decrease the chances of the fungus surviving, developing, and reproducing (Pringle and Taylor 2002; Chin et al. 2001; Ghini and Kimati 2000). Therefore, research on the fitness of resistant populations is crucial to predict the behavior of the mutation regarding different management recommendations, which contributes to establishing and strengthening anti-resistance strategies (Mikaberidze and McDonald 2015). Fitness is most often investigated in stressful conditions (Hawkins and Fraaije 2018), as in the oxidative and osmotic stress assays used in some studies (Amiri et al. 2020; Veloukas et al. 2014).

The presence of fitness penalties has been evaluated in *P. pachyrhizi* populations presenting mutations in the *Cyp51* and *Cytb* genes, which confer resistance to DMI and QoI fungicides, respectively (Klosowski et al. 2016). In an assay on detached leaves (Klosowski et al. 2016), the stability in the *Cyp51* and *Cytb* alleles was described by applying 50 mg/l of mancozeb over 4 generations of the fungus. The results indicated the presence of fitness penalties related to mutations in the *Cyp51* gene with a reduction in the frequency of mutated isolates in each generation. As for the F129L mutation in the *Cytb* gene, the presence of fitness penalties was not detected since the mutated isolate competed equally with the wild type (Klosowski et al. 2016).

Since *P. pachyrhizi*'s resistance to SDHI fungicides was detected in the 2015/2016 season (Simões et al. 2017), little is known about the effects of the I86F mutation in the *SdhC* gene (*SdhC*-I86F) regarding the fungus' fitness and stability. For these reasons, studies are required to provide better recommendations to field

managers. In this sense, using pathogen populations and commercial fungicides is beneficial for these studies.

This study aimed at the following objectives: (I) to genotype six field populations from different geographical regions and fungicide managements regarding the presence and frequency of mutations; (II) to investigate whether the *SdhC*-I86F mutation was stable after the fungus propagation both in the absence and presence of a commercial fungicide mixture containing SDHI, similar to what may occur in the field; (III) to evaluate the populations' sensitivity to the commercial fungicides azoxystrobin + benzovindiflupyr (site-specific) and mancozeb (multisite); and (IV) to investigate components of fitness for populations with the *SdhC*-I86F mutation.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sampling *P. pachyrhizi* populations from the field and detached leaf assay

Populations of *P. pachyrhizi* were obtained from field collections of naturally infected soybean leaves presenting ASR symptoms, which occurred during the 2017/2018 soybean season (Table 1). In order to obtain greater representativeness, six populations from two of the main Brazilian soybean producing regions were selected (Figure 1). The populations differ mainly in terms of climate (Supplementary Figure S1) but also present different fungicide managements (Supplementary Table S1).

From southern Brazil, four populations were collected from the state of Paraná: two from the Mideast region of the state, one from the east, and one from the west region. From the northeastern country, two populations were collected from west of the state of Bahia. Only one population from the south was collected from an untreated area during the host-free period - the other ones differ in terms of the fungicides used. The populations from the northeastern country differ in management since one of them stemmed from a collection area that received fungicide applications, as opposed to the other. All populations (Table 1) were collected at the end of the season and the crops

were at the R6 to R7 stage (Fehr and Caviness, 1977), except for the population collected in the host-free period.

The spores of infected soybean leaflets collected from the field were removed with a soft brush. Subsequently, they were inoculated on healthy soybean leaves (BMX-Potencia RR[®] cultivar), which were grown in a greenhouse susceptible to ASR. The spore suspension was prepared in autoclaved distilled water containing 0.01% Tween20 (Dinâmica[®], Brazil) and the leaflets were inoculated on the abaxial surface using an airbrush Alpha 3 (0.3 mm nozzle, Arprex[®], Brazil). After inoculation, the leaflets were incubated in transparent polystyrene Petri dishes (90 x 15 mm, KASVI[®], Brazil) containing 2% water agar (Agar for bacteriological use, KASVI[®], Brazil) and 30 mg/l streptomycin sulfate (Dinâmica[®], Brazil). The dishes were incubated in a growth chamber at 22 °C in the dark for 24 h and then exposed to a 12 h:12 h light/dark photoperiod at 20 ± 1 °C for 15 to 20 days (Model EL101/, Eletrolab, Brazil). The new sporulating uredias present on the incubated leaflets were transferred to new leaflets, following the method described above, until reaching the necessary amount of inoculum to perform the experiments (Supplementary Figure S2).

2.2 Molecular characterization of mutations in *Cyp51*, *Cytb*, and *SdhC* genes of *P. pachyrhizi* populations

The populations were sequenced for mutations in the genes of 14 α -sterol demethylase (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*), and subunit C of succinate dehydrogenase (*SdhC*). The sequencing was carried out at three timepoints. The first timepoint was after the populations' field collection, when the mutations in the genes *Cyp51*, *Cytb*, and *SdhC* were analyzed. The second timepoint was after 18 months of consecutive transfers (36 generations) to new healthy soybean leaflets, which were carried out every 15 days. These leaflets were detached from the cultivar BMX-Potência RR[®] and grown in a greenhouse in the absence of fungicides, as already described in the previous methodology for the detached leaf assay. The third timepoint was after one generation in the presence of commercial fungicide (azoxystrobin +

benzovindiflupyr), which occurred after 36 generations of consecutive transfers in detached leaves with no fungicides and from the second timepoint.

For the second and third timepoint, only the *SdhC* gene was sequenced. The methodologies used in the different timepoints of the molecular analysis are described in the next topics (Supplementary Figure S2).

2.2.1 First timepoint: molecular characterization of mutations of *P. pachyrhizi* populations from field collections

In order to verify the frequencies of mutations present in the populations collected from the field, the *Cyp51*, *Cytb*, and *SdhC* genes were sequenced. For this purpose, four symptomatic leaves from each field collection were separated and stored for molecular analysis.

2.2.1.1 DNA extraction

Four leaflets of each population with symptoms of ASR were stored in kraft paper envelopes (60 x 90 mm 120 g, Scrity, Brazil) and dried for 4 days in a 7-liter glass desiccator (Plena Lab, Brazil) containing 500 g of silica gel 4-8 mm (Synth, Brazil). Afterward, the samples were submitted for DNA extraction. Leaflets were cut with a bistoury, and the small pieces containing *P. pachyrhizi* lesions were placed in 2 ml microtubes with three stainless steel beads (5 mm, Qiagen, Germany). The material was homogenized using a TissueLyser II (Qiagen, Germany) machine for 2.5 minutes twice. The homogenized tissue was extracted using the NucleoSpin DNA Plant II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) and following the manufacturer's instructions for the PL1 buffer (CTAB) protocol, as described by Klosowski et al. (2016) and Schmitz et al. (2013). The extracted DNA was quantified using the spectrophotometer BioPhotometer plus (Eppendorf, Germany).

2.2.1.2 Genetic analysis of the *Cyp51* and *Cytb* genes

For the detection and frequency determination of the mutations in the *Cyp51* and *Cytb* genes, DNA samples were amplified through PCR using a PyroMark PCR Master Mix Kit (Qiagen, Germany). The reaction mix volume was 25 μ L, of which 12.5 μ L was the master mix, 2.5 μ L was Coral Load, 2.5 μ L was primer Fw (0.2 μ M), 2.5 μ L was primer Rv (0.2 μ M), 2.5 μ L was DNA (100 ng), and 2.5 μ L was nuclease-free water (Qiagen, Germany). The PCR were performed in a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, United States). The primers used for the amplification of each gene are described in Supplementary Table S2. The PCR conditions were 45 cycles for 30 s at 94 °C (denaturation), 60 °C (annealing), and 72 °C (extension), followed by a 10 min final extension at 72°C.

The pyrosequencing reactions were performed following the methodology of Klosowski et al. (2018), Klosowski et al. (2016), and Schmitz et al. (2013) with some modifications. Twenty microliters of the PCR products were used for pyrosequencing analyses, which were performed in a PyroMark Q24 Advanced instrument (Qiagen, Germany). The sequencing reactions were prepared using the PyroMark Q24 Advanced Reagents Kit (Qiagen, Germany) and according to the manufacturer's protocol. PCR products were immobilized with Streptavidin Sepharose beads (GE Healthcare, UK) for 15 min at 1400 rpm in a Mix Mate (Eppendorf, Germany). After this step, in a Vacuum Pre-Worktable, the immobilized single strand of DNA was cleaned up with 70% ethanol, denaturated with PyroMark Denaturation Solution (Qiagen, Germany), and washed with PyroMark Wash Buffer (Qiagen, Germany). Then, the samples were transferred to sequencing plates containing a mixture of Annealing Buffer (Qiagen, Germany) with the specific sequencing primer (0.3 μ M) for each gene (Supplementary Table S2). The plates were heated at 80 °C for 5 min in an incubator and submitted to the pyrosequencing reaction.

2.2.1.3 Genetic analysis of the *SdhC* gene

The quantitative detection of the *SdhC*-I86F mutation was carried out through a real-time quantitative PCR (qPCR) using a Mastercycler® RealPlex2 instrument (Eppendorf, Germany). The primers and probe are described according to Simões et al. (2017) in Supplementary Table S2. The Takyon NoRox Probe 2X Master Mix (Eurogentec, Belgium) was used for the reactions with the following volumes: 12.5 µL of master mix, 0.25 µL of probe, 1.5 µL of primer Fw (0.1 µM), 1.5 µL of primer Rv (0.1 µM), 2.5 µL of DNA (100 ng), and 6.75 µL of nuclease-free water. The PCR cycling conditions were 5 min on hold at 95°C, followed by 45 cycles at 95°C for 15s, and at 60°C for 60s. The relative frequencies of the different alleles (sensitive and resistant) were calculated according to the methodology described by Germer et al. (2000), where the frequency of the allele₁ = $1/(2^{\Delta C_t} + 1)$.

2.2.2 Second timepoint: molecular characterization of mutations of *P. pachyrhizi* populations after 18 months (36 generations) in the absence of fungicides

From the initial time of sampling and subsequent genotyping of the *SdhC* gene, populations were subjected to 36 generations of consecutive transfers to new healthy soybean leaflets with no contact with fungicides, meaning there was no selection pressure to any chemical group for 36 generations of the fungus.

2.2.3 Third timepoint: molecular characterization of mutations of *P. pachyrhizi* populations after a generation with fungicide

After 35 generations of the *P. pachyrhizi* populations in the absence of fungicides, a new generation was subjected to 4 concentrations (0.05 µg/ml, 0.5 µg/ml, 15 µg/ml, and 50 µg/ml) of the benzovindiflupyr molecule, which is present in the commercial fungicide (azoxystrobin + benzovindiflupyr). In this assay, after 15 days of incubation, the leaves of each concentration group that presented rust symptoms were collected and stored for molecular analysis of the *SdhC*-I86F mutation presence. The leaves came from the fungicide sensitivity assay, which was carried out following the

detached leaf methodology of the Fungicide Resistance Action Committee - FRAC (Scherb and Mehl, 2006) with some modifications. This methodology is described below.

2.3 Fungicide sensitivity assay

The sensitivity of the populations (Table 3) was evaluated for commercial fungicides. A mixture of the single-site fungicides azoxystrobin (FRAC Group code 11) and benzovindiflupyr (FRAC Group code 7), and the multisite fungicide Unizeb Gold® UPL, which belongs to the chemical group dithiocarbamate - mancozeb (FRAC Group code M03) (FRAC, 2021b), were used. The populations used were collected after the aforementioned 35 generations.

The experimental design was completely randomized, with four repetitions for each condition. Experimental treatments included nine concentrations of azoxystrobin + benzovindiflupyr and ten of mancozeb. Each Petri dish with one leaf added was considered an experimental unit. This trial was carried out following the detached leaf methodology of the Fungicide Resistance Action Committee - FRAC (Scherb and Mehl, 2006) with some modifications. The assays for each fungicide were repeated twice.

Unifoliolate soybean leaflets (BMX-Potencia RR® cultivar) were collected from healthy soybean leaves grown in a greenhouse. The leaves were dipped for 3 seconds in different concentrations of benzovindiflupyr (0 µg/ml, 0.05 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1, 5 µg/ml, 15 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, and 300 µg/ml), the active ingredient of the commercial fungicide (azoxystrobin + benzovindiflupyr); and mancozeb (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 300 µg/ml, and 500 µg/ml), the active ingredient of the multisite commercial formulation. After the leaves dried for approximately 30 min in the presence of ambient light, they were plated in transparent polystyrene Petri dishes (90 x 15 mm, KASVI®, Brazil) containing 2% water agar (Agar for bacteriological use, KASVI®, Brazil) and 30 mg/l streptomycin sulfate (Dinâmica®, Brazil), and incubated in a growth chamber (Model EL101/1, Eletrolab, Brazil) with a 12 h:12 h light/dark photoperiod at 20 ± 1 °C. Spores were inoculated

after 24 h on the abaxial leaf surface with an airbrush Alpha 3 (0.3 mm nozzle, Arprex®, Brazil) and a suspension of 1×10^5 uredospores/ml, which was prepared with distilled water + 0.01% Tween20 (Dinâmica®, Brazil) and calibrated with the aid of a hemocytometer.

After inoculation, the leaves were placed in Petri dishes again, which were sealed with plastic wrap and incubated in a growth chamber (Model EL101/1, Eletrolab, Brazil) in the dark at $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ during the first 12 hours, then submitted to a 12 h:12 h light/dark photoperiod at $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, following the methodology described by Scherb and Mehl (2006) with some modifications. After 15 days, the severity of the disease on the leaves was evaluated with the aid of a diagrammatic scale (Godoy et al. 2006) and the EC_{50} , that is, the effective fungicide concentrations that reduce pathogen activity or disease symptoms by 50%, was calculated (Ritz 2015).

2.4 Fitness Assays

Fitness assays were conducted on all the six populations (Table 1) to assess sensitivity to osmotic stress, oxidative stress, and ultraviolet radiation. All assays were conducted in a completely randomized design, with four replicates for each treatment, and with each Petri dish being an experimental unit. The populations used were collected after 36 generations.

2.4.1 Sensitivity to osmotic stress

Spore germination was evaluated in transparent polystyrene Petri dishes (90 x 15 mm) with a medium containing 2% water agar and different concentrations of NaCl (0%, 0.25%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2%, and 5%). These concentrations are equivalent to the molarity of 0 mol/l, 0.043 mol/l, 0.086 mol/l, 0.17 mol/l, 0.26 mol/l, 0.34 mol/l, and 0.86 mol/l and present an osmotic potential of 0 MPa, -0.21 MPa, -0.42 MPa, -0.84 MPa, -1.28 MPa, -1.68 MPa, and -4.24 MPa, respectively. Seventy μL of suspension

(1×10^4 uredospores/ml), which was calibrated with the aid of a hemocytometer, was added and spread with a Drigalski spatula.

The plates were then incubated in the dark for 12 hours in a growth chamber at $24^\circ\text{C} \pm 1$ (Blum et al. 2015). After this period, 3 drops of lactophenol were placed on each plate to stop germination. The percentage of spore germination inhibition was evaluated in relation to the control (untreated). One hundred spores per plate were counted with the aid of microscopy. Spores with a germ tube at least longer than its largest diameter were considered germinated (Blum et al. 2015).

2.4.2 Sensitivity to oxidative stress

Spore germination was evaluated in a medium containing 2% water agar with different concentrations of paraquat (0 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ and 500 $\mu\text{g/ml}$) from the commercial herbicide Gramoxone® Syngenta - HRAC Group code C3 (HRAC 2021). Both evaluation and calculation followed the same method used for the osmotic stress assay, which is described above.

2.4.3 Sensitivity to UV radiation

The germination of spores subjected to different times of exposure to UV radiation was evaluated. Spore suspensions were plated in transparent polystyrene Petri dishes (90 x 15 mm) containing 2% water agar, which were stored open in a laminar flow chamber 50 cm away from a 30W germicidal ultraviolet Toshiba lamp (UV radiation of 0.254 μm and 150 ± 3 Lux). The plates were exposed to UV light for 0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 13 min, and 15 min, then closed and stored in a growth chamber at 24°C in the dark for 12 h. Germination was stopped and evaluated according to the method used in the previous assays. The UV radiation was measured with a digital lux meter (MINIPA-MLM-1020, Brazil). The distance and time of exposure range were determined based on a pre-test.

A methodological figure is available in Supplementary Figure S2 to illustrate and complement the description of all assays performed in this study.

2.5 Statistical analysis

The values obtained in the sensitivity assays (detached leaves) were tested for homogeneity of variances between treatments using the Bartlett test. The data were then submitted to the `drm()` function of the DRC package in the R software (Ritz 2015). The three-parameter *log-logistics* model (*LL.3*) was used. The *LL.3* model was parameterized using an equation with a coefficient (*b*) that denotes the slope of the dose-response curve, (*d*) the upper asymptote (limit corresponding to the control - untreated), and (*e*) the effective EC₅₀ concentration. The three-parameter logistic function with a lower limit of 0 is:

$$(x) = 0 + \frac{(d - 0)}{(1 + \exp(b(\log(x) - \log(e))))}$$

The values of the (*b*), (*d*), and (*e*) parameters were determined. The EC₅₀ values were calculated for the value corresponding to half the amplitude of the dose-response curve (EC₅₀ = *d*/2). Comparisons of the EC₅₀ values between populations were performed using the *t* test with a significance level ($p \leq 0.05$).

The fitness assays (*in vitro*) germination values were calculated for values of percentage of spore germination inhibition in relation to the control. Subsequently, these germination data were tested for homogeneity of variances between treatments using the Bartlett test. An ANOVA was performed to measure the variance and a significance test was provided using the *F*-test and *P*-values. When significant, the means were compared in pairs by the Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test ($p \leq 0.05$) to determine if there are significant differences between biological characteristics. These analyses were performed in the *ExpDes.pt* package in the R software (Ferreira, Cavalcanti, and Nogueira 2014).

3 RESULTS

3.1 Molecular characterization of mutations of *P. pachyrhizi* populations from field collection - first timepoint

The populations and their respective mutations in the *Cyp51*, *Cytb*, and *SdhC* genes are described in Table 1. We assessed the frequency of specific fungicide resistance alleles in *SdhC*, *Cyp51*, and *Cytb* using a pyrosequencing assay. This analysis showed that most populations have mutations in all analyzed genes, except for population Pr18-1, which carried the wild type allele I86 in the *SdhC* gene, a target of SDHIs. For clarity purposes, this population's wild type (Pr18-1) will be referred throughout the text as "WT_{*SdhC*}" in reference to this gene.

The maximum frequency for the *SdhC*-I86F mutation did not reach 50% for any of the populations analyzed after the field collection. As for the mutation points investigated in the *Cyp51* gene (F120L, I145F, K142R, Y131H/F, and I475T), all populations presented mutations in at least three of the five analyzed points, which are targeted by DMIs. The populations' most frequent mutation points for this gene were F120L, I145F, and K142R. All populations presented the I145F mutation, however at a frequency below 10%. Only the BA18-1 population did not show the F120L mutation. I475T was the only mutation in the *Cyp51* gene absent in all populations. Regarding the *Cytb* gene, all populations presented a high frequency (100%) of the F129L mutation in the target gene of Qols.

3.2 Molecular characterization of mutations of *P. pachyrhizi* populations after 18 months (36 generations) in the absence of fungicides - second timepoint

The PR18-1 population showed no change in relation to the initial frequency of the I86 allele (0%) observed in the field sample, remaining a WT_{*SdhC*} after 36 generations (0%) in the absence of selection pressure (Table 2). Three out of 5 populations that already had the *SdhC*-I86F mutation in the field sample retained the

frequency of the I86F allele after 36 generations. However, two populations (PR18-4 and BA18-2) showed a reduction in this frequency, which reduced the initial frequency by 43% and 60%, respectively.

3.3 Molecular characterization of mutations of *P. pachyrhizi* populations after a generation with fungicide – third timepoint

In general, there was an increase in the frequency of SDHIs' target mutation (*SdhC*-I86F) after one fungus generation in the presence of fungicide containing the molecule of this chemical group (Table 2). The mean frequency of the *SdhC*-I86F mutation changed from 29% at the control treatment (0.00 µg/ml) to 45% at the 50 µg/ml concentration. The PR18-1 population, which was a WT_{*SdhC*} since field collection, presented a frequency of 8% for the 0.05 µg/ml concentration (data not shown) and reached 46% at the highest concentration used (Table 2). When compared to the frequency after 36 generations presented in the control treatment (0.00 µg/ml), the PR18-4 and BA18-2 populations showed an increase of 79% and 138%, respectively, in the frequency of their *SdhC*-I86F mutations at the 50 µg/ml concentration.

3.4 Fungicide sensitivity test

The results indicate that the EC₅₀ values show significant differences ($p \leq 0.05$) between populations for both fungicides used (azoxystrobin + benzovindiflupyr and mancozeb) (Table 3). For the azoxystrobin + benzovindiflupyr fungicide, the EC₅₀ values of *P. pachyrhizi* populations ranged from 0.06 ug/ml (PR18-1) to 57.16 ug/ml (PR18-2), differing statistically from the other populations ($P = 2.2e-16$). BA18-1 and PR18-4 did not show statistical differences between them ($P = 0.60$). Their EC₅₀ values were significantly higher than those of PR18-3 and BA18-2, which also did not differ from each other ($p > 0.05$).

As for mancozeb, populations PR18-1 and PR18-4 ($P = 3.238e-0.8$) differed statistically from each other, with an EC₅₀ value variation of 111.33 ug/ml. The EC₅₀ of the PR18-3 and BA18-2 populations ($P = 0.003$) showed a significant difference

between them and in relation to the others, with intermediate values of the calculated EC_{50} . The PR18-2 and BA18-1 populations ($P = 0.10$) presented statistically equal EC_{50} , despite differing significantly from the others.

3.5 Sensitivity to osmotic stress

The germination of all populations was affected by the saline medium (Table 4). With 5% NaCl concentration in the medium, the percentage of spore germination inhibition reached 100% for all populations. The 0.5% and 1% NaCl concentrations in the medium were the most discriminatory since they were the only ones that presented significant differences ($p \leq 0.05$) between WT_{SdhC} PR18-1 and the other populations. At these concentrations, the PR18-1 population showed the lowest percentage of spore germination inhibition when compared to the others. As for the 1% concentration, PR18-1 population presented an inhibition percentage 43% lower than the average of the other populations.

3.6 Sensitivity to oxidative stress

The results indicate that the germination of *P. pachyrrhizi* spores is affected by the paraquat addition. There was a reduction in the percentage of inhibition (Table 5) as the concentrations increased. The 10 µg/ml and 100 µg/ml concentrations were the most discriminatory ($p \leq 0.05$). The PR18-1 population differed statistically from the others, presenting a spore germination inhibition 33% lower than the other populations at the 100 µg/ml paraquat concentration. At the concentration of 10 µg/ml, populations PR18-3 and BA18-2 differed statistically from the others, presenting the highest percentage of spore germination inhibition.

3.7 Sensitivity to UV radiation

The germination of *P. pachyrhizi* populations was affected when they were subjected to different UV radiation exposure times (Table 6). UV light has shown to be effective with 15 minutes of exposure since inhibition reached 100%. With 4 min of exposure, the average inhibition of all populations was 47.50%, and, with 10 min, they reached the average value of 90.89%. However, no significant differences ($p>0.05$) were observed between the populations for this fitness component.

A results figure (Supplementary Figure S3) is available to summarize and complement the results of this study.

4 DISCUSSION

The results provide evidence of fitness penalties due to the *SdhC*-I86F mutation. Populations with the *SdhC*-I86F showed a significantly higher sensitivity compared to the PR18-1 (WT_{*SdhC*}) population for both osmotic and oxidative stress. Similarly, a significant change in EC₅₀ values was observed for the fungicides used when comparing the WT_{*SdhC*} population with the ones presenting the *SdhC*-I86F mutation. However, there was no difference between *SdhC*-I86F and WT_{*SdhC*} regarding the germination percentage of spores exposed to UV radiation. Populations with the *SdhC*-I86F mutation survived in the absence of selection pressure for 36 generations, demonstrating that, in lab conditions, this mutation is stable for at least this number of generations. However, in just one generation in the presence of the SDHI fungicide, the WT_{*SdhC*} population presented the *SdhC*-I86F mutation.

Our results for the fitness components indicate the presence of fitness penalties in *SdhC*-I86F mutated populations, which may reduce the ability of this genotype to compete and survive in field conditions during the crop season. Interestingly, after 36 generations, the frequency of the *SdhC*-I86F mutation was reduced only in the PR18-4 populations (host-free period) and BA18-2 (organic farming), probably because they remained in field conditions with no selection pressure for a longer period. Moreover, the presence and frequency reduction of the *SdhC*-I86F mutation was described based on the molecular analysis of 1,384 field samples from the 2017 - 2020 seasons, which were collected in August (host-free period) instead of during the growing seasons (September to February) (FRAC, 2020). For the *Cyp51* and *Cytb* genes, the stability

of the mutation in monouredial isolates of *P. pachyrhizi* in the absence of fungicides was maintained for over 50 generations (Müller, 2019).

The increase in the frequency of the *SdhC*-I86F mutation was gradual for the WT_{*SdhC*} population depending on the concentration used, reaching 46% at 50 µg/ml. The *SdhC*-I86F may have been present at a low initial frequency, below the qPCR detection point, as described by Simoes et al. (2017). For other populations it was also observed that the higher the concentration, the higher the frequency of mutation detected. The monitoring of the 2015-2019 soybean-seasons in Brazil for the *SdhC*-I86F mutation showed an increase from 7% (2015) to 90% (2019), which was associated with the intensive use of SDHI molecules (Mello et al. 2021). This information corroborates with the data obtained in this study, that found an increased frequency of this mutation after one generation of the fungus in the presence of SDHI.

The maximum frequency of the *SdhC*-I86F mutation in the 2017/2018 season's populations was 48%. This result indicates that the mutation is stable in populations across different Brazilian regions, as the highest mutation frequency described is approximately 50% (Simões et al. 2017; Müller et al. 2021; Mello et al. 2021). Since the fungus maintains a copy of its nucleus with no mutation, possible due to its dikaryotic nature (Simões et al. 2017), finding a 50% mutation frequency in the field would, in fact, indicate that 100% of the population presents it, as is the case for other fungi (Fan et al. 2015). Regarding climate conditions and the mutations analyzed, no relationship was observed (Fig. S1).

Mutations in the *Cyp51* gene showed frequency values below 40% for all points analyzed. Despite *P. pachyrhizi* being dykariotic, as mentioned before, the possibility of heterokaryosis allows the fungus to maintain a functional wild-type nucleus, as the presence of a mutation such as I86F in both nuclei could impair fitness to an extreme degree, inducing an increase in deleterious or even lethal characteristics. Therefore, presenting only one mutated nucleus is the ideal condition since the fungus would still survive even if the mutation causes fitness penalties, and even in the absence of selection pressure (Simões et al. 2017). This might be a survival strategy of *P. pachyrhizi* in relation to mutations in the *SdhC* and *Cyp51* genes.

As for the *Cytb* gene, the frequency of the F129L mutation was 100% in the populations analyzed. A high frequency was already expected in current Brazilian

populations due to the resistance stability caused by the lack of fitness penalties (Klosowski et al. 2016).

In our study, the populations carrying the *SdhC*-I86F mutation were less sensitive than the WT_{*SdhC*} to the fungicide azoxystrobin + benzovindiflupyr, which has an SDHI molecule. It corroborates the hypothesis that this mutation may be responsible for SDHI-resistant *P. pachyrhizi* isolates (Simões et al. 2017). However, this fungicide still exhibits control efficacy since the populations were controlled by azoxystrobin + benzovindiflupyr.

The EC₅₀ values of *SdhC*-I86F mutants treated with azoxystrobin + benzovindiflupyr were higher than those described by Simões et al. (2017), meaning it may have been an increase in the resistance range over the soybean seasons. However, it is worth mentioning that these authors used different methods: in their sensitivity tests, they treated the soybean leaves in a spray chamber with volumes equal to 1000 L ha⁻¹ and calculated the EC₅₀ values using a linear model; we used a commercial mixture of azoxystrobin + benzovindiflupyr and three-parameter logistic function to calculate EC₅₀ values. These differences could explain some of the variation found.

In the detached leaf assay, the *SdhC*-I86F mutants presented a difference in sensitivity for mancozeb when compared to the WT_{*SdhC*}. This result suggests that populations with the *SdhC*-I86F mutation suffer fitness penalties that increase their sensitivity to this compound. However, we observed no direct relationship between the frequency of the *SdhC*-I86F mutation in all populations analyzed and the estimated sensitivity value for mancozeb. Future studies should address this topic.

Even exposure to low concentrations of this multisite fungicide can act as a stressor and interfere with their development. The application of mancozeb was also used for stressing in competitive fitness tests to assess the stability of the mutation frequency after four generations of the mixture of isolates with mutations in the *Cyp51* and *Cytb* genes (Klosowski et al. 2016). In relation to the control treatment, no statistical difference was identified for the frequency of these mutations using sublethal concentration (50 mg/l), differing from the concentrations we tested.

The reduction in sensitivity to one chemical group (SDHI) and simultaneous increase to another (dithiocarbamate), as occurred in our study, can have a positive

impact on the management of this mutation in the field. Nevertheless, the exposure of the fungicide to environmental factors may interfere with this result since mancozeb is a multisite fungicide, meaning it is more vulnerable to losses - whether through photodegradation, rainwater, or irrigation - and is easily removed from the plant surface (Hunsche et al. 2007; Cabras et al. 2001).

The *SdhC*-I86F mutation was responsible for hypersensitivity to osmotic stress in all populations used in this study: compared to the WT_{*SdhC*}, the mutants were hypersensitive to the saline medium, exhibiting high percentages of spore germination inhibition. In this sense, hypersensitivity to saline stress in *SdhC*-I86F mutants may be related to some alteration in the osmoregulatory pathway of cell walls. When spores are placed to germinate in a hypertonic medium or environment, where the solute concentration is higher than that of the spore, they lose water, causing dehydration, loss of turgor, and eventual death (Chen et al. 2016). Thus, our results corroborate the one described for *Botrytis cinerea* isolates with mutations in the *SdhC* gene (Shao et al. 2020; Amiri et al. 2020; Chen et al. 2016; Veloukas et al. 2014). In contrast, the opposite has also been described for the same gene in *Alternaria solani* (Bauske and Gudmestad 2018), as the mutation was not found to be related to penalties. Our results give additional support to the hypothesis that *P. pachyrhizi* genotypes that are resistant to SDHIs may not successfully compete in nature in comparison to sensitive strains due to the presence of this penalty.

The *SdhC*-I86F mutants also showed hypersensitivity to oxidative stress, which indicates the presence of fitness penalties that may undermine the spread of the mutation in the field due to competitive disadvantages compared to the WT_{*SdhC*}. It has been observed that mutations in the *SdhC* gene cause the generation and accumulation of succinate dependent reactive oxygen species (ROS), known to cause hypoxia. This process leads to accelerated aging due to a reduction in enzyme activity, which, in turn, contributes to increased ROS levels and hypersensitivity to oxidative stress, producing several effects in organisms, such as in *Botrytis cinerea* (Amiri et al. 2020) and *Mycosphaerella graminicola* (Scalliet et al. 2012). These studies corroborate our findings. Moreover, ROS are involved both in oxidative stress and fungal pathogenicity. In plant-pathogen interaction, it plays an important role since the plant quickly produces ROS as a defense reaction upon recognizing the pathogen (Heller

and Tudzynski, 2011). The adaptation of pathogens to oxidative stress is, therefore, fundamental to pathogenicity.

In addition, the herbicide paraquat used in the oxidative stress assay is applied in soybean cultivation both for pre-seeding weed control and pre-harvest desiccation (MAPA 2020). Our results suggest that populations with the *SdhC*-I86F mutation are more affected by this herbicide compared to the WT_{*SdhC*}. Recently in Brazil, this molecule was banned and the remaining stocks were allowed to be used in the 2020/2021 harvest (MAPA/ANVISA, 2020).

In the UV radiation sensitivity assay, exposure time affected the germination of spores in all populations; however, the inhibition percentages among populations were not significant, which indicates that the presence of the *SdhC*-I86F mutation does not cause hypersensitivity to UV radiation. The SDH gene is composed of four subunits (A, B, C, and D), which correspond to the sites of complex II of the mitochondrial respiratory chain, a functional part of the tricarboxylic cycle (Cecchini 2003; Keon, White and Hargreaves, 1991). Thus, since gene function is related to respiration and cell energy (Matsson and Hederstedt 2001), populations with this mutation are unlikely to be affected by UV radiation. Furthermore, our UV light assay methodology may not have been the most suitable for this study. On the other hand, as demonstrated, UV radiation affects the germination and survival rates of *P. pachyrhizi* spores (Young et al. 2012; Rotem and Aust, 1991).

Since it was observed mutation stability, which evidences the occurrence of fitness penalties, the anti-resistance strategies described by the FRAC (2021a) can be effective to reduce mutation frequency. Strategies such as the host-free period, crop calendar, and, especially, mancozeb application can facilitate the management of this resistance. We would like to emphasize that, to our knowledge, this is the first study that describes the use of paraquat to evaluate oxidative stress in the germination of *P. pachyrhizi* spores and that relates its effect to the genetics, fitness, and stability of the fungal populations.

In addition, we also emphasize that only one WT_{*SdhC*} population was used and compared with the five other *SdhC*-I86F mutated population. Populations could also have mutations in other subunits in the *Sdh* gene, as occurs in other pathogens, which was not investigated in our study. Therefore, we recommend that further studies with

more WT_{SdhC} populations investigate new mutations. Moreover, using sole SDHI molecules will be more appropriate to describe and understand the adaptability of these populations in Brazil.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Academic Publishing Advisory Center (Centro de Assessoria de Publicação Acadêmica, CAPA – www.capa.ufpr.br) of the Federal University of Paraná (UFPR) for assistance with English language translation and editing. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The first author thanks the 'Instituto Federal Catarinense' IFC - Concórdia/SC – Brazil for the opportunity to study at UFPR. The last author received research fellowships from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil.

LITERATURE CITED

- Amiri, A., Zuniga, A., Peres, N. 2020. Mutations in the Membrane-Anchored SdhC Subunit Affect Fitness and Sensitivity to Succinate Dehydrogenase Inhibitors in *Botrytis cinerea* Populations from Multiple Hosts. *Phytopathology*. 10.1094/phyto-07-19-0240-r.
- Bauske, M. J., Gudmestad, N. C. 2018. Parasitic Fitness of Fungicide-Resistant and-Sensitive Isolates of *Alternaria solani*. *Plant Dis*. 102:666-673.
- Blum, M. M. C., Reis, E. M., Franciei, T. V., Carlini, R. 2015. *In vitro* effect of substrate, temperature and photoperiod on *Phakopsora pachyrhizi* urediniospore germination and germ tube growth. *Summa Phytopathol*. 41(2):101-106. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1999>.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Melis, M., Pirisi, F. M., Cabitza, F., Pala, M. 2001. The effect of simulated rain on folpet and mancozeb residues on grapes and on vine

- leaves. Journal of environmental Science and Health, New York, v. 36, n. 5, p. 609-618.
- CAF. 2020. Parceria público-privada no combate à ferrugem asiática da soja. Consórcio antiferrugem (CAF). Available at: <http://www.consorcioantiferrugem.net/#/main>.
- Cecchini, G. 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. Annu. Rev. Biochem. 72:77-109.
- Chen, S. N., Luo, C. X., Hu, M. J., Schnabel, G. 2016. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* isolates with resistance to multiple chemical classes of fungicides. Phytopathology 106:997-1005.
- Chin, K. M., Chavaillaz, D., Kaesbohrer, M., Staub, T., Felsenstein, F. G. 2001. Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* to strobilurins. Crop Protection, 20, 87–96.
- Cook, N. M., Chng, S., Woodman, T. L., Warren, R., Oliver, R. P., Saunders, D. G. 2021. High frequency of fungicide resistance-associated mutations in the wheat yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Pest Manag Sci. doi: 10.1002/ps.6380.
- Fan, Z., Yang, J.-H., Fan, F., Lou, C.-X., Schnabel, G. 2015. Fitness and competitive ability of *Alternaria alternata* field isolates with resistance to SDHI, QoI, and MBC fungicides. Plant Dis. 99:1744-1750.
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., 1977. Stages of Soybean Development. Iowa State University, Ames, IA.
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P. and Nogueira, D. A. (2014) ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Applied Mathematics*, **5**, 2952-2958. <http://dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280>.
- FRAC. 2020. Medidas essenciais contra a ferrugem asiática em soja. Frac Fungicide Resistance Action Committee-BRASIL. Available at: <https://www.frac-br.org/post/medidas-essenciais-contr-a-ferrugem-asiatica-em-soja>.
- FRAC. 2021a. Novas recomendações para o manejo da ferrugem da asiática da soja. Frac Fungicide Resistance Action Committee-BRASIL. Available at: <https://www.frac-br.org/soja>.

- FRAC. 2021b. FRAC Code List – 2021: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). Available at: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2.
- Germer, S., Holland, M. J., Higuchi, R. 2000. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res* 10:258–266.
- Ghini, R., Kimati, H. 2000. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 78p.
- Godoy, C. V., Koga, L. J., Canteri, M. G. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatol. Bras.* 31:63–68.
- Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Guimarães, F. C. M., Meyer, M. C., Costamilan, L. 2016. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesq. Agrop. Bras.* 10.1590/S0100.
- Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U., Koch, E. and Schaffrath, U. 2010. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol. Plant Pathol.* 11, 169–177.
- Hawkins, N. J., Fraaije, B. A., 2018. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56, 339–60.
- Heller, J., Tudzynski, P., 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 369–390. doi 10.1146/annurev-phyto-072910-095355.
- HRAC, 2021. Mode of Action Classification 2021. Herbicide Resistance Action Committee (HRAC). Available at: https://hracglobal.com/files/HRAC_MOA_Poster_May_7_2021.pdf.
- Hunsche, H., Damerow, L., Schmitz-Eiberger, M., Noga, G., 2007. Mancozeb wash-off from apple seedlings by simulated rainfall as affected by drying time of fungicide deposit and rain characteristics. *Crop Prot.* 26, 768–774.
- Latorra, D., Campbell, K., Wolter, A., Hurley, J. M. 2003. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum. Mutat.* 22:79–85. Keon, J. P., R., White, G. A., Hargreaves, J. A. 1991.

- Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr. Genet.* 19, 475–481.
- Klosowski, A. C., Brahm, L., Stammler, G., May De Mio, L. L. 2016. Competitive fitness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates with mutations in the CYP51 and CYTB genes. *Phytopathology* 106:1278-1284.
- Klosowski, A. C., Castellar, C., Stammler, G., May De Mio L. L. 2018. Fungicide sensitivity and monocyclic parameters related to the *Phakopsora pachyrhizi* - soybean pathosystem from organic and conventional soybean production systems. *Plant Pathol* 67:1–9.
- Klosowski, A. C., May De Mio, L. L., Miessner, S., Rodrigues, R., Stammler, G. 2015. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Manag. Sci.* v. 72, p. 1211-1215, 2016.
- MAPA. 2020. Agrofit - Banco de dados produtos agroquímicos. Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Available at: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- MAPA/ANVISA. 2020. INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA SDA-MAPA/ANVISA-INC Nº 3, DE 22 DE OUTUBRO DE 2020. Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Available at: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-conjunta-sda-mapa/anvisa-inc-n-3-de-22-de-outubro-de-2020-283477122>.
- Matsson, M., Hederstedt, L. 2001. The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33:99-105.
- Mello, F. E., Mathioni, S. M., Fantin, L. H., Rosa, D. D., Antunes, R. F. D., Filho, N. R. C., Duvaresh, D. L., Canteri, M. G. 2021. Sensitivity assessment and SDHC-I86F mutation frequency of *Phakopsora pachyrhizi* populations to benzovindiflupyr and fluxapyroxad fungicides from 2015 to 2019 in Brazil. *Pest Manag Sci.* doi: 10.1002/ps.6466.

- Mikaberidze, A., McDonald, B. A. 2015. Fitness cost of resistance: Impact on management. in: Fungicide Resistance in Plant Pathogens. H. Ishii and D. W. Hollomon, eds. Springer, Tokyo. P. 77-89.
- Müller, M. A. 2019. Resistência Múltipla, seleção à campo e estabilidade das mutações EM isolados de *Phakopsora pachyrhizi* aos fungicidas IDM, IQe e ISDH. 2019. 73p. Tese (Doutorado) em Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Müller, M. A., Stammer, G., May De Mio, L. L. 2021. Multiple resistance to DMI, QoI and SDHI fungicides in field isolates of *Phakopsora pachyrhizi*, Crop Protection. ISSN 0261-2194. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105618>.
- Pringle, A., Taylor, J. W. 2002. The fitness of filamentous fungi. Trends Microbiol. 10:474-481.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. Gerhard, D. 2015. Dose-response analysis using R. PLoS One 10, e0146021.
- Rotem, J., Aust, H. J. 1991. The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. Phytopathology 133:76-84.
- Scalliet, G., Bowler, J., Luksch, T., Kirchhofer-Allan, L., Steinhauer, D., Ward, K., Niklaus, M., Verras, A., Csukai, M., Daiana, A., Fonné-Pfister, R. 2012. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. PLoS One 7:e35429.
- Scherb, C. T., Mehl, A. 2006. Detached leaf monitoring method. Comitê de ação a resistência a fungicidas (FRAC). Available at: <http://www.frac.info/monitoring-methods>.
- Schmitz, H. K., Medeiros, C. Craig, I. R., Stammer, G. 2013. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards Qo inhibitors and demethylation inhibitors, and corresponding resistance. Pest Management Science, n. 70, p. 378-388.
- Shao, W. Sun, J., Zhang, X., Z., Chen, C. 2020. Amino acid polymorphism in Succinate dehydrogenase subunit C involved in biological fitness of *Botrytis cinerea*. Mol Plant Microbe In. doi.org/10.1094/mpmi-07-19-0187-r.

- Simões, K., Hawlik, A., Rehfus, A., Gava, F., Stammmler, G. 2017. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. J. Plant Dis. Protect. v. 125, p. 21-26.
- Veloukas, T., Kalogeropoulou, P., Markoglou, A. N., Karaoglanidis, G. S. 2014. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. Phytopathology 104:347–356.
- Yorinori, J. T., Paiva, W. M., Frederick, R. D., Costamilan, L. M., Bertagnolli, P. F., Hartman, G. E., Godoy, C. V., Nunes, J., Jr. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. Plant Dis. 89:675-677.
- Young, H., George, S., Narvaez, D., Srivastava, P., Schuerger, A., Wright, D., Marois . 2012. Effect of solar radiation on severity of soybean rust. Phytopathology 102: 794-803.

TABLES

Table 1. *Phakopsora pachyrhizi* populations used and information regarding collection and mutations in the demethylase genes of cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*), and succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*)

Code ^Y	Populations	Geographic Origin	Management	Season	Mutations - (mutation frequency %) ^X							
					Cyp51 gene				Cytb gene			
					F120L	I145F	K142R	Y131H/F	I475T	F129L	SdhC gene	
GmPp-PR18-1		Mideastern Paraná - Palmeira - BR	Conventional	2017-2018	32	9	11	0	0	100	100	Wild type
GmPp-PR18-2		Mideastern Paraná - Ponta Grossa - BR	Conventional	2017-2018	30	6	9	0	0	100	100	46
GmPp-PR18-3		Eastern Paraná - Campo Magro - BR	Conventional	2017-2018	32	6	14	28	0	100	100	43
GmPp-PR18-4		Western Paraná - Palotina - BR	Host-free period	2018	38	7	10	22	0	100	100	47
GmPp-BA18-1		Western Bahia - Luis Eduardo Magalhães - BR	Conventional	2017-2018	0	3	11	21	0	100	100	39
GmPp-BA18-2		Western Bahia - Luis Eduardo Magalhães - BR	Organic	2017-2018	40	7	14	16	0	100	100	48

^X Analyzed frequencies of leaves from field collection.

^Y The populations of *Phakopsora pachyrhizi* belong to the LEMID lab and their full nomination is GmPp (*Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*). Their Brazilian state and number correspond to: GmPp-PR18-1, GmPp-PR18-2, GmPp-PR18-3, and GmPp-PR18-4 (state of Paraná); GmPp-BA18-1 and GmPp-BA18-2 (state of Bahia). In the text, we mention only state and number for the population designation.

Table 2. Frequency of *SdhC*-I86F analyzed in leaves from untreated leaves and treated with different concentrations of azoxystrobin + benzovindiflupyr

Populations			Mutation <i>SdhC</i> gene - (frequency I86F %)			
			Analyzed frequencies from the field and after 36 generations		Frequencies analyzed after 1 generation with fungicide Azoxystrobin + Benzovindiflupyr ($\mu\text{g/ml}$) ^z	
Code	Geographic Origin	Management	Field frequencies ^x	Frequencies after 36 generations ^y	0.5	15
GmPp-PR18-1	Mideastern Paraná - Palmeira - Brazil	Conventional	0	0	6	43
GmPp-PR18-2	Mideastern Paraná - Ponta Grossa - Brazil	Conventional	46	42	-	47
GmPp-PR18-3	Eastern Paraná - Campo Magro - Brazil	Conventional	43	42	-	51
GmPp-PR18-4	Western Paraná - Palotina - Brazil	Host-free period	47	27	-	42
GmPp-BA18-1	Western Bahia - Luís Eduardo Magalhães - Brazil	Conventional	39	43	-	44
GmPp-BA18-2	Western Bahia - Luís Eduardo Magalhães - Brazil	Organic	48	19	-	34

^x Analyzed frequencies of leaves from field collection.

^y After 36 generations (18 months) of consecutive transfers to detached leaves in the absence of fungicides.

^z After 1 generation of detached leaves treated with different concentrations of the fungicide Azoxystrobin + Benzovindiflupyr.

Table 3. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* populations with different mutations in the demethylase genes cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*), and succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*) to azoxystrobin (quinone outside inhibitors-Qol) + benzovindiflupyr (succinate dehydrogenase inhibitor-SDHI), and the multi-site mancozeb in a detached leaf assay

Population	Genotype			Azoxystrobin + Benzovindiflupyr ^z		Mancozeb ^z	
	<i>Cyp51</i> ^x	<i>Cytb</i>	<i>SdhC</i>	Range	^y Mean $\pm$ SE	Range	^y Mean $\pm$ SE
GmPp-PR18-1	M5	F129L	Wild type	0.037-0.093	0.06 $\pm$ 0.014 d	102.90-138.73	120.81 $\pm$ 9.09 a
GmPp-PR18-2	M5	F129L	I86F	47.46-66.85	57.16 $\pm$ 4.92 a	33.87-45.66	39.76 $\pm$ 2.99 b
GmPp-PR18-3	M6	F129L	I86F	14.39-24.19	19.29 $\pm$ 2.48 c	24.79-33.57	29.18 $\pm$ 2.23 c
GmPp-PR18-4	M6	F129L	I86F	17.91-39.30	28.61 $\pm$ 5.42 b	6.22-11.12	8.67 $\pm$ 1.24 e
GmPp-BA18-1	M7	F129L	I86F	25.24-39.35	32.30 $\pm$ 3.58 b	41.58-53.09	47.34 $\pm$ 2.92 b
GmPp-BA18-2	M6	F129L	I86F	9.56-15.61	12.58 $\pm$ 1.53 c	13.33-20.95	17.14 $\pm$ 1.93 d

^x Mutations in the *Cyp51* gene for each population: M5 (F120L; I145F; K142R); M6 (F120L; I145F; K142R; Y131H); M7 (I145F; K142R; Y131H).

^y Effective concentration values in $\mu\text{g/ml}$ of each fungicide to inhibit disease severity by 50%.

^z Values followed by the same letter in the column do not differ by the *t* test ($p > 0.05$).

Table 4. Effect of NaCl on spore germination of *Phakopsora pachyrhizi* populations with different mutations in the demethylase genes cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*), succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*)

Population	Genotype			Fitness component (% spore germination inhibition) ^Y						
	<i>Cyp51</i> ^x	<i>Cytb</i>	<i>SdhC</i>	NaCl (0,25%)	NaCl (0,5%)	NaCl (1%)	NaCl (1,5%)	NaCl (2%)	NaCl (5%) ^Z	
GmPp-PR18-1	M5	F129L	Wild type	21.64 $\pm$ 7.39 c	29.24 $\pm$ 1.51 c	41.81 $\pm$ 11.03 b	76.02 $\pm$ 9.04 b	95.90 $\pm$ 3.09	100 $\pm$ 0.00	
GmPp-PR18-2	M5	F129L	I86F	38.66 $\pm$ 5.74 ab	57.14 $\pm$ 9.65 ab	75.21 $\pm$ 8.82 a	82.77 $\pm$ 12.23 ab	99.58 $\pm$ 0.84	100 $\pm$ 0.00	
GmPp-PR18-3	M6	F129L	I86F	24.47 $\pm$ 6.06 bc	44.33 $\pm$ 1.04 b	75.89 $\pm$ 14.51 a	90.78 $\pm$ 4.41 a	99.29 $\pm$ 1.42	100 $\pm$ 0.00	
GmPp-PR18-4	M6	F129L	I86F	39.80 $\pm$ 5.40 a	63.26 $\pm$ 7.64 a	68.88 $\pm$ 14.76 a	91.33 $\pm$ 4.53 a	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	
GmPp-BA18-1	M7	F129L	I86F	28.28 $\pm$ 3.77 abc	46.31 $\pm$ 1.59 b	76.23 $\pm$ 15.41 a	90.98 $\pm$ 6.62 a	99.59 $\pm$ 0.82	100 $\pm$ 0.00	
GmPp-BA18-2	M6	F129L	I86F	24.77 $\pm$ 6.22 bc	46.33 $\pm$ 2.55 b	73.85 $\pm$ 20.83 a	89.91 $\pm$ 8.54 ab	99.57 $\pm$ 0.92	100 $\pm$ 0.00	

^x Mutations in the *Cyp51* gene for each population: M5 (F120L; I145F; K142R); M6 (F120L; I145F; K142R; Y131H); M7 (I145F; K142R; Y131H).

^Y Values followed by the same letter in the column are not significantly different according to Tukey's (HSD) test ($p>0.05$).

^z Nonsignificant concentrations according to Tukey's (HSD) test ($p>0.05$).

Table 5. Effect of paraquat on spore germination of *Phakopsora pachyrhizi* populations with different mutations in the demethylase genes cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*) and succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*)

Population		Genotype		Fitness component (% spore germination inhibition) ^Y					
Code	<i>Cyp51</i> ^X	<i>Cytb</i>	<i>SdhC</i>	Paraquat 1 μ g/ml	Paraquat 10 μ g/ml	Paraquat 100 μ g/ml	Paraquat 500 μ g/ml		
GmPp-PR18-1	M5	F129L	Wild type	1.75 $\pm$ 0.96 c	7.50 $\pm$ 4.04 d	48.75 $\pm$ 6.85 b	76.25 $\pm$ 9.03 b		
GmPp-PR18-2	M5	F129L	I86F	16.95 $\pm$ 2.37 ab	39.13 $\pm$ 4.08 b	77.39 $\pm$ 5.66 a	92.60 $\pm$ 2.47 a		
GmPp-PR18-3	M6	F129L	I86F	7.50 $\pm$ 2.38 bc	52.5 $\pm$ 6.45 a	70.00 $\pm$ 5.29 a	81.25 $\pm$ 3.93 b		
GmPp-PR18-4	M6	F129L	I86F	8.00 $\pm$ 2.94 bc	28.00 $\pm$ 5.72 c	67.00 $\pm$ 4.97 a	83.00 $\pm$ 10.52 ab		
GmPp-BA18-1	M7	F129L	I86F	15.33 $\pm$ 3.62 ab	30.00 $\pm$ 4.76 bc	70.00 $\pm$ 8.29 a	85.33 $\pm$ 8.76 ab		
GmPp-BA18-2	M6	F129L	I86F	22.50 $\pm$ 5.57 a	55.00 $\pm$ 4.16 a	77.50 $\pm$ 6.76 a	83.33 $\pm$ 4.19 ab		

^Z Mutations in the *Cyp51* gene for each population: M5 (F120L; I145F; K142R); M6 (F120L; I145F; K142R; Y131H); M7 (I145F; K142R; Y131H).

^Y Values followed by the same letter in the column are not significantly different according to Tukey's (HSD) test ($p>0.05$).

Table 6. Effect of UV radiation on spore germination of *Phakopsora pachyrhizi* populations with different mutations in the demethylase genes cytochrome P450 C-14 α -sterol (*Cyp51*), cytochrome b (*Cytb*) and succinate dehydrogenase in subunit C (*SdhC*)

Population		Genotype		Fitness component (% spore germination inhibition) ^Y							
Code		<i>Cyp51</i> ^X	<i>Cytb</i>	<i>SdhC</i>	UV (2 min)	UV (4 min)	UV (6 min)	UV (8 min)	UV (10 min)	UV (13 min)	UV (15 min)
GmPp-PR18-1		M5	F129L	Wild type	16.66 ± 17.41	57.54 ± 13.37	78.57 ± 10.40	89.68 ± 19.32	95.63 ± 3.97	99.60 ± 0.79	100 ± 0.00
GmPp-PR18-2		M5	F129L	I86F	14.07 ± 11.91	62.6 ± 14.93	81.85 ± 7.40	86.3 ± 15.22	91.48 ± 4.89	98.88 ± 1.41	100 ± 0.00
GmPp-PR18-3		M6	F129L	I86F	9.37 ± 4.27	31.64 ± 6.39	53.12 ± 11.76	67.19 ± 16.66	90.62 ± 4.94	98.33 ± 1.50	100 ± 0.00
GmPp-PR18-4		M6	F129L	I86F	14.40 ± 17.36	43.88 ± 19.37	80.58 ± 9.44	81.29 ± 11.32	87.05 ± 4.55	97.48 ± 2.46	99.28 ± 1.43
GmPp-BA18-1		M7	F129L	I86F	21.66 ± 14.97	41.66 ± 10.54	71.66 ± 13.81	81.25 ± 9.54	90.00 ± 4.30	98.33 ± 1.36	100 ± 0.00
GmPp-BA18-2		M6	F129L	I86F	22.22 ± 6.11	47.66 ± 9.51	73.50 ± 9.41	82.05 ± 9.11	90.59 ± 5.84	97.43 ± 2.20	100 ± 0.00

^X Mutations in the *Cyp51* gene for each population: M5 (F120L; I145F; K142R); M6 (F120L; I145F; K142R; Y131H); M7 (I145F; K142R; Y131H).

^Y Fitness component found not significant according to Tukey's (HSD) test ($p>0.05$).

FIGURE LEGENDS

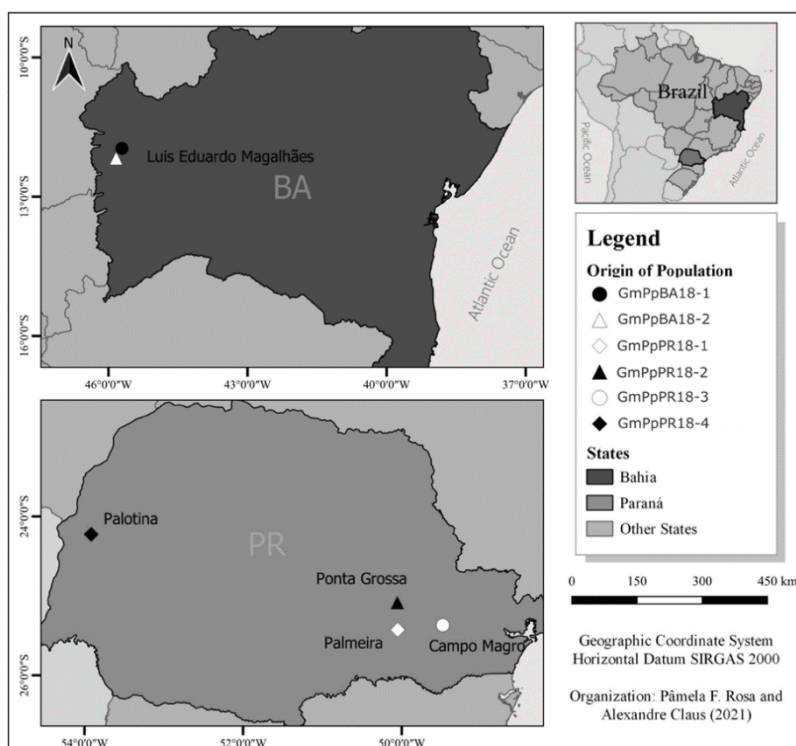
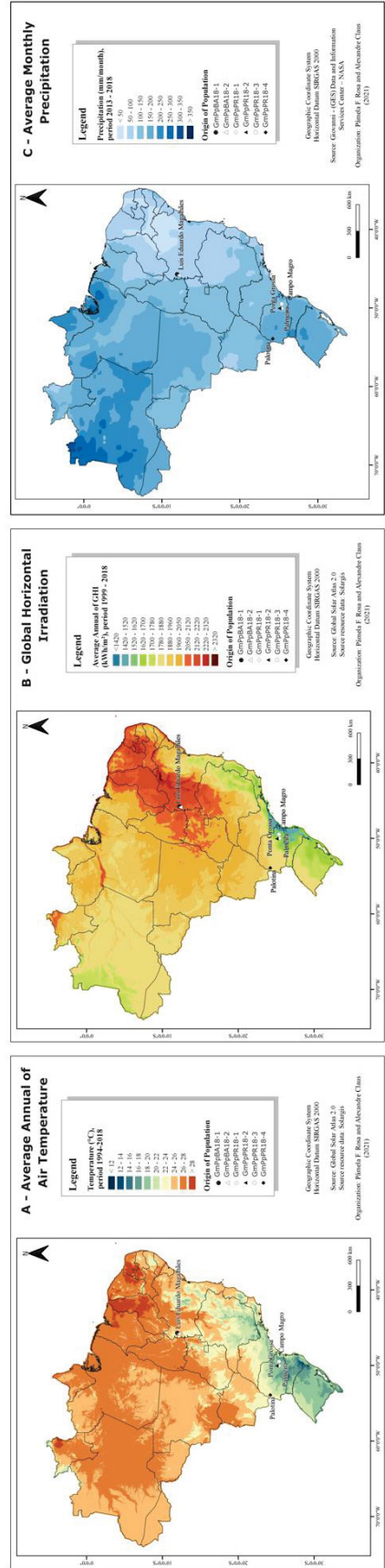


Figure 1. Origin of *Phakopsora pachyrhizi* populations in Brazil map. Leaves samples were collected of soybean plants infected with Asian soybean rust during the 2017/2018 soybean seasons. Brazilian States: BA - Bahia and PR - Paraná. Municipalities: BA - Luís Eduardo Magalhães; PR - Campo Magro, Palmeira, Palotina, and Ponta Grossa.

e-Xtras
SUPPLEMENTARY - FIGURE LEGENDS

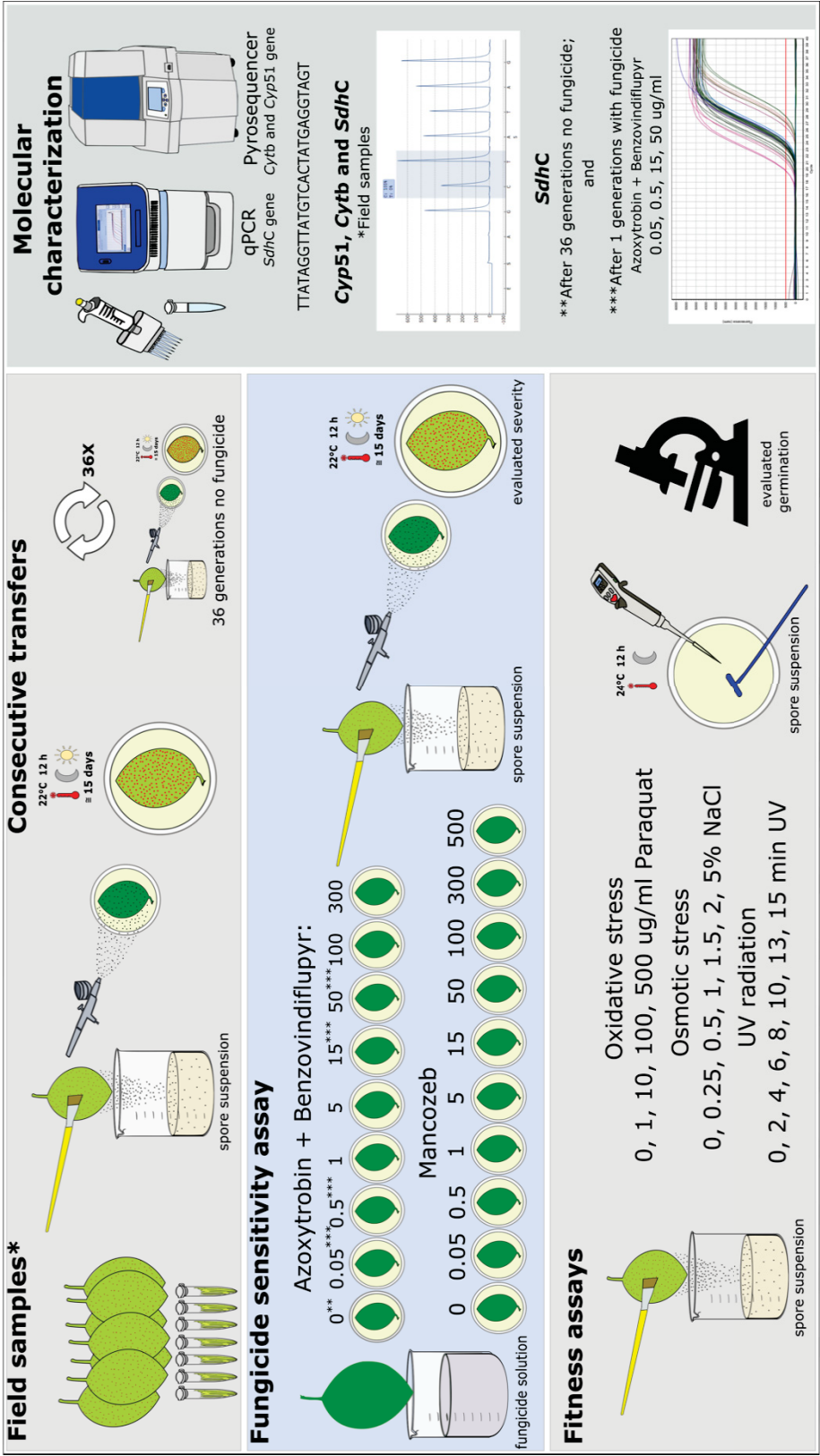


Fonte: O autor (2021).

Supplementary Figure S1. Maps of the climatological conditions of Brazil. Temperature (A), Irradiation (B), and Precipitation (C).

Names on the map are of the municipalities where the *Phakopsora pachyrhizi* populations were collected. **Link to Supplementary**

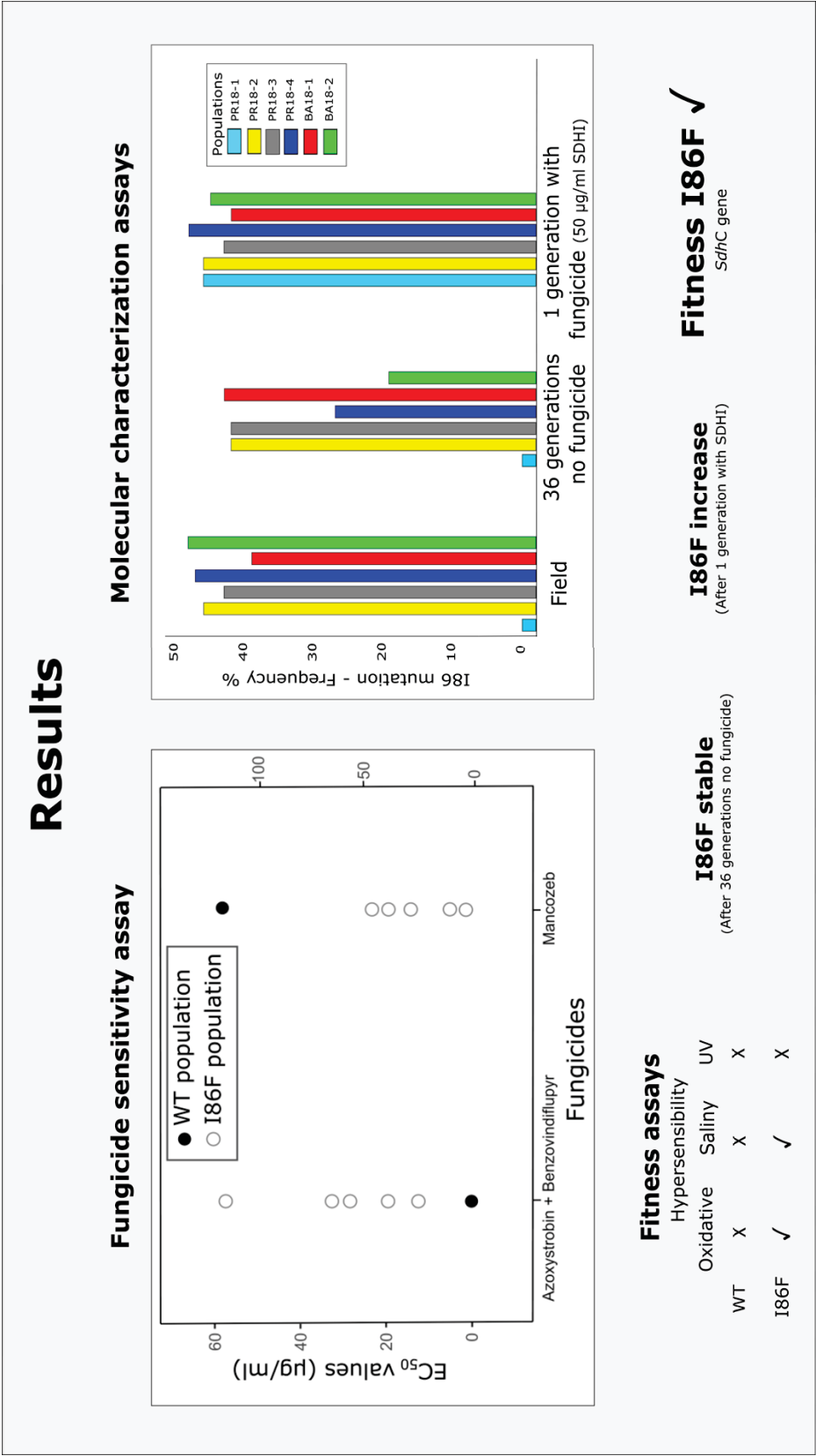
Figure S1: <https://doi.org/10.7910/DVN/YYWB9N>



Fonte: O autor (2021).

Supplementary Figure S2. Illustration of the methodological steps developed in this work, which helps to understand each essay.

Link to Supplementary Figure S2: <https://doi.org/10.7910/DVN/YYWB9N>



Fonte: O autor (2021).

Supplementary Figure S3. Illustration of the main results from the fungicide sensitivity, molecular characterization and fitness assays. **Link to Supplementary Figure S3:** <https://doi.org/10.7910/DVN/YYW9N>

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table S1. Chemical treatments with commercial fungicides carried out in the field areas where the populations were collected and number of sprays

Supplementary Table S2. Oligonucleotide primers used for sequencing the *Sdh* subunit C, *Cytb* and *Cyp51* genes of *Phakopsora pachyrhizi*

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table S1. Chemical treatments with commercial fungicides carried out in the field areas where the populations were collected and number of sprays

Populations		Spray treatments ^x					
Code	Collection date	Chemical group and FRAC code	1st Application	2nd Application	3rd Application	4th Application	
GmPp-PR18-1	4/5/2018	SDHI (7); QOI (11); DMI (3)	Fluxapyroxad + Pyraclostrobin ^a	Trifloxystrobin + Prothioconazole ^e	-	-	
GmPp-PR18-2	3/15/2018	SDHI (7); QOI (11); DMI (3)	Azoxystrobin + Benzovindiflupyr ^b	Trifloxystrobin + Tebuconazole ^f	-	-	
GmPp-PR18-3	3/29/2018	SDHI (7); QOI (11); DMI (3)	Dimoxystrobin + Boscalid ^c ; Picoxystrobin + Cyproconazole ^d	-	-	-	
GmPp-PR18-4	6/6/2018	-	-	-	-	-	
GmPp-BA18-1	3/28/2018	SDHI (7); QOI (11); DMI (3); Dithiocarbamate (M03)	Fluxapyroxad + Pyraclostrobin ^a	Azoxystrobin + Benzovindiflupyr ^b	Trifloxystrobin + Prothioconazole ^e	Tebuconazole + Picoxystrobin ^g ; Mancozeb ^h	
GmPp-BA18-2	3/28/2018	-	-	-	-	-	

^x Trade name and registration company: ^aOrquestra[®] (BASF); ^bElatus[®] (Syngenta); ^cSpot[®] (BASF); ^dAproach[®]Prima (Corteva); ^eFox[®] (Bayer); ^fNativo[®] (Bayer); ^gHorus[®] (ADAMA); ^hUnizeb Gold[®] (UPL).

Supplementary Table S2. Oligonucleotide primers used for sequencing the *Sdh* subunit C, *Cytb* and *Cyp51* genes of *Phakopsora pachyrhizi*

Gene	Primers	Sequence 5'-3'	Objective	Reference
<i>Sdh-C</i>	Kes 2153 fw	AAACCACCGTAGATCACTGATGT	Amplification of <i>Sdh-C</i> , 1171 bp with KES 2155 or 2156 rv	
	KES 2155 rv	AACAGCTAACTTGGTATTCAGGA	Amplification and sequencing of <i>Sdh-C</i> , 103 bp with KES 2153 fw	Latorra et al. (2003); Simoes et al. (2017).
	Kes 2156 rv	AACAGCTAACTTGGTATTCAGGT	Amplification and sequencing of <i>Sdh-C</i> , 103 bp with KES 2153 fw	
	Probe 5'	FAMAAACGGGTTGCGCTCTTACAGGAGGTATTC-BHQ1	Detection of <i>Sdh-C</i> gene	
<i>Cyt-b</i>	KES 498 fw	GGACACTAGTATGGGCGATTG	Pyrosequencing of <i>Cytb</i> , 124 bp fragment with KES 499 rv	
	KES 499x rv	CATGTGAGGGCGGTCTCATT	Pyrosequencing of <i>Cytb</i> , 124 bp fragment with KES 498 fw	Klosowski et al. (2016); Schmitz et al. (2013).
	KES 500 fw	TTGTAATAATAGCGACAGC	Pyrosequencing of <i>Cytb b</i> (F129L), sequencing <i>primer</i>	
	KES 1496 x fw	GTTTTAACTTTTTTGATGGCCTGAA	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (Y131F, Y131H), 101 bp f fragment with KES 1493 rv	
	KES 1493 rv	CTGCTGCATTAGGATCGAGTTG	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (Y131F, Y131H), 101 bp f fragment with KES 1496 fw	
	KES 1494 rv	CGAGTTGGGTACATCR	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (Y131F, Y131H), sequencing <i>primer</i>	
	KES 1564 x fw	ACCCTTTGTTGATGAGAAAGTGTC	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (K142R, I145F), 396 bp f fragment with KES 1563 rv	
<i>Cyp51</i>	KES 1563 rv	ACGTCCTTAGTGACAGATTTTACATTT	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (K142R, I145F), 396 bp f fragment with KES 1564 fw	Klosowski et al. (2018); Schmitz et al. (2013).
	KES 1562 rv	GTAAGGCCAGCCTTG	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (K142R, I145F), sequencing <i>primer</i>	
	KES 1595 fw	AGGAAGCATGGAAATGTGTTTAC	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (F120L), 273 bp fragment with KES 1596 rv	
	KES1596 x rv	TCCTTACCAAAGACAGGTGTAGC	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (F120L), 273 bp fragment with KES 1595 fw	
	KES 1594 fw	GAAGAGCTTACACCCAT	Pyrosequencing of <i>Cyp51</i> (F120L), <i>primer</i> sequencing	

X 5' Biotin labelling

III CAPÍTULO 2 - POTENCIAL DO USO DE HERBICIDAS PARA O CONTROLE DE OÍDIO EM SOJA TRANSGÊNICA²

Alexandre Claus^{1,2}, Letícia de Arruda Salles², Arthur Arrobas Martins Barroso², Louise Larissa May De Mio^{2*}

¹Instituto Federal Catarinense, IFC. Rodovia SC 283 - km 17. CEP 89703-720, Concórdia, SC, Brasil. ²Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, UFPR, Universidade Federal do Paraná CEP 80035-050, Curitiba, PR, Brasil.

*Corresponding author: maydemio@ufpr.br

Resumo

A engenharia genética tem possibilitado o desenvolvimento de cultivos mais produtivos e com maiores opções para o manejo de pragas e plantas daninhas. A soja com a transgenia (DAS44406-6) Enlist E3[®] - E3, geneticamente modificada, reúne genes para resistência a insetos (Bt) e tolerância aos herbicidas glifosato, 2,4-D e glufosinato de amônio. O efeito da introdução desta soja e do uso destes herbicidas não é conhecido no comportamento de doenças. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de herbicidas em soja E3 na severidade de oídio, por ser uma doença que pode ocorrer desde a fase vegetativa, momento em que é feito o controle de plantas daninhas. Os herbicidas glifosato, 2,4-D, glifosato+2,4-D e glufosinato de amônio foram aplicados de forma preventiva e curativa em relação ao oídio em pós-emergência da soja E3. Foram avaliados a severidade do oídio em sete ensaios, e calculado a área abaixo da curva do progresso da doença. Na média das observações, o glifosato+2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio reduziram a severidade do oídio em 88,28, 74,06, 64,41%, respectivamente. A inibição da doença ocorreu em tratamentos preventivos e curativos, atuando de forma sistêmica, e também residual. Isoladamente a aplicação de 2,4-D não alterou a severidade da doença em aplicações em estádio V4. A tecnologia E3 poderá trazer vantagens para o manejo de oídio, além dos já previstos para plantas daninhas e insetos. Este trabalho é pioneiro ao utilizar esta soja e herbicidas aplicados em pós-emergência e sua relação com o oídio.

Palavras-chave: *Erysiphe diffusa*; *Glycine max*; Enlist E3[®]; 2,4-D; Glifosato; Glufosinato.

² Capítulo organizado conforme normas da revista *Crop Protection*.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma das principais *commodities* produzidas no mundo, sendo o Brasil o maior produtor mundial desta oleaginosa, seguido dos Estados Unidos e Argentina (USDA, 2021). Entre os principais fatores que limitam a sua produção podemos destacar as plantas daninhas, pragas e doenças (Hartman et al. 2011). Dentre as principais doenças na cultura da soja, destaca-se o oídio, cujo agente causal é o fungo biotrófico *Erysiphe diffusa* (syn. *Microsphaera diffusa*). Essa doença, que nos últimos anos, recebeu maior atenção devido aos danos observados no Brasil, Estados Unidos, Paraguai e Bolívia (Santos et al. 2018; Dunn & Gaynor, 2020). *E. diffusa* pode infectar a planta em qualquer estágio do seu desenvolvimento, sendo mais comum na fase vegetativa e início da floração e, quanto mais cedo ocorrer, maior serão as perdas de rendimento (Igarashi et al. 2010). O controle químico do oídio geralmente é realizado por meio de aplicações preventivas de fungicidas. Porém, por algumas vezes, o controle é realizado de forma curativa (Toigo et al. 2008).

O desenvolvimento de culturas/organismos geneticamente modificadas (OGM), tem sido utilizado com o intuito de facilitar o manejo de plantas daninhas, pragas e doenças. Muitas vezes essas estratégias podem reduzir o uso de agrotóxicos e aumentar a produção, auxiliando na promoção da segurança alimentar (Oliver, 2016; Pickett, 2016). A primeira variedade de soja com a tecnologia Roundup Ready® - RR, que possui tolerância ao glifosato, marcou o início dos OGMs em 1996 (Green & Owen, 2011). Desde então, vem ocorrendo uma rápida expansão do desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas, com predomínio de dois tipos: tolerância a herbicidas, principalmente ao glifosato (Gly), com a soja RR, que foi obtida com a inserção de um gene da bactéria *Agrobacterium* spp; e resistência a insetos, quase que exclusivamente a lepidópteras, com a tecnologia Bt, obtida por meio inserção de genes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que produz uma proteína tóxica a lagartas (Brookes & Barfoot, 2012). No entanto, quanto à resistência a doenças, poucos avanços ocorreram. Uma das limitações para este caso, é a falta genes de resistência das próprias cultivares de “elite”, que são o foco dos programas de melhoramento tradicional (Pickett, 2016). Outro entrave, é a rápida adaptabilidade de patógenos, o que faz com que a resistência genética seja suplantada (McDonald & Linde, 2002), o que leva também a seleção de cepas com resistência aos fungicidas.

O cultivo comercial da soja RR no Brasil se iniciou em 2003 e, esta tecnologia é aceita mundialmente com sucesso devido aos benefícios no manejo de plantas daninhas (Fialho et al. 2011; Green & Owen, 2011). Por esse motivo, a utilização do Gly também aumentou e a molécula se tornou o herbicida mais comercializado no mundo (Fialho et al. 2011; Duke, 2018). O uso contínuo de um único herbicida pode levar ao aumento de casos de plantas daninhas resistentes (Fartyal et al. 2018). Apenas para o Gly, são descritos 338 casos de resistência em 30 países de todo o mundo (Heap, 2021). Desta forma, estratégias de manejo que incluem o uso alternado ou combinado de vários herbicidas em conjunto devem ser preconizadas (Fartyal et al. 2018).

Por esses motivos, desenvolver plantas transgênicas com mais de uma tolerância a herbicidas pode ser uma ótima estratégia (Fartyal et al. 2018), no entanto, ainda é um grande desafio nos programas de melhoramento (Bonny, 2016). Recentemente, a Corteva (Indianápolis, IN) por meio de transgênia DAS44406-6, desenvolveu a soja Enlist E3®, com tolerância múltipla aos herbicidas glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético colina e glufosinato de amônio. A soja com esta tecnologia foi liberada para cultivo no Brasil na safra 2021/2022.

Os herbicidas são uma importante ferramenta para a produção agrícola, devido à sua eficácia no controle de plantas daninhas, correspondendo a quase 50% do uso total de pesticidas no mundo (Kao et al. 2019). Além disso, os herbicidas glifosato, 2,4-D e glufosinato de amônio serão cada vez mais utilizados em pós-emergência da cultura da soja, considerando a soja E3 e outros organismos geneticamente modificados com tolerância a estes produtos. Devido aos constantes relatos de patógenos fúngicos com resistência a fungicidas na cultura da soja (Schmitz et al. 2013; Klosowski et al. 2015; Simões et al. 2017), herbicidas com eficiência de controle de doenças poderiam oferecer um componente adicional ao manejo.

Sabe-se que devido a interações entre herbicida x planta x patógeno, os herbicidas podem vir a interferir o desenvolvimento, reprodução, distribuição e sobrevivência de patógenos de plantas. Tanto os herbicidas, como as plantas daninhas, podem influenciar o desenvolvimento de doenças de plantas de forma direta e indireta, agindo nos três vértices do triângulo da doença (hospedeiro, patógeno e nos fatores ambientais bióticos e abióticos). De forma direta, afetam especificamente o patógeno, e indireta, com o herbicida atuando sobre as características da planta (Kortekamp, 2011; Sardrood & Goltapeh, 2018).

Devido ao tempo da tecnologia RR que confere tolerância da soja ao Gly, muitos estudos vêm sendo realizados, como os que relacionam a aplicação de Gly com a ocorrência de doenças de plantas, seja quando aplicado diretamente em cultivares RR ou não (Altman & Campbell, 1977; Johal & Huber, 2009; Mengistu et al. 2013; Hammerschmidt, 2018; Martinez et al. 2018; Sardrood & Goltapeh, 2018; Einhardt et al. 2020). Aplicações de Gly em culturas RR são relatadas como responsáveis pelo aumento e redução de doenças de plantas (Sardrood & Goltapeh, 2018). Quando utilizado em aplicações foliares em soja RR, foi descrito aumento de algumas doenças, como as causadas por *Corynespora cassiicola* (Huber et al. 2005) e *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (Johal e Huber, 2009). Para redução de doenças na soja RR, é descrito para *Phakopsora pachyrhizi* (Feng et al. 2005; Feng et al. 2008) e *Erysiphe diffusa* (Silva, 2016). Também é descrito que o Gly não possui nenhum efeito sobre os patógenos fúngicos de doenças das plantas, e isso pode variar de acordo com o tipo e cepa do patógeno, do tipo de planta e cultivar (Sanyal & Shrestha, 2008; Samac & Foster-Hartnett, 2012; Mengistu et al. 2013). Devido a divergência de resultados da ação do Gly para patógenos, ainda não foi esclarecido uma relação causa-efeito (Kao et al. 2019).

Com a recente tecnologia de tolerância tripla a herbicidas embarcadas na soja com a transgenia DAS44406-6 (Enlist E3®), que prevê o uso do ácido 2,4-diclorofenoxiacético colina (2,4-D), glufosinato de amônio (Glu) e Gly, não se sabe se a aplicação foliar de 2,4-D, Glu e, mais a mistura comercial de Gly+2,4-D apresentam alguma relação na ocorrência de doenças.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram (i) investigar o efeito da aplicação foliar dos herbicidas 2,4-D, Glu, Gly, Gly+2,4-D em soja com tecnologia Enlist E3® na severidade de oídio; (ii) verificar se ocorre algum efeito aditivo, sinérgico ou antagônico com a mistura comercial do 2,4-D ao Gly na inibição desta doença; (iii) estudar a duração da inibição após a aplicação dos herbicidas e, (iv) verificar a sistemicidade em planta dos herbicidas na ocorrência do oídio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivares e produtos

A soja com tecnologia DAS44406-6 (Enlist E3[®]) possui tolerância aos herbicidas 2,4-D, Glu e Gly foi utilizado nos ensaios de inibição do oídio. Esta apresenta ciclo de desenvolvimento indeterminado e grupo de maturação relativa (GMR) 5.7. A cultivar BMX Potência RR[®], suscetível ao oídio, foi utilizado como fonte de inóculo.

Os seguintes herbicidas e doses foram utilizados: 581.69 g ea ha⁻¹ do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina (Enlist[®] Colex-D[®], 668.62 g L⁻¹, Dow AgroSciences) (2,4-D); 171.40 g ea ha⁻¹ glufosinato de amônio (Finale[®], 200 g ea L⁻¹, BASF) (Glu); 624 g ea ha⁻¹ de glifosato sal dimetilamina (Glizmax Prime[®], 480 g L⁻¹, Dow AgroSciences) (Gly); 615 g ea ha⁻¹ glifosato sal dimetilamina + 585 g ea ha⁻¹ ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina (EnlistDuo[®] Colex-D[®], 205 g ea L⁻¹ + 195 g ea ha⁻¹, Dow AgroSciences) (Gly+2,4-D). O seguinte fungicida foi utilizado: 40 g i.a. ha⁻¹ trifloxistrobina + 80 g i.a. ha⁻¹ tebuconazol (Nativo[®], 100 g L⁻¹ + 200 g L⁻¹, Bayer) (PC).

2.2 Descrição dos ensaios

As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 5 L preenchidos com solo. Cinco sementes da soja com tecnologia DAS44406-6 (Enlist E3[®]) - E3 foram semeadas em cada vaso e, após a completa expansão das folhas primárias – unifolioladas, em estágio (VC) (Fehr et al. 1971), foi realizado desbaste para duas plantas por vaso. O solo foi irrigado duas vezes por semana após a emergência e adubado com o formulado NPK 5-20-20, aos 10 e 25 dias após emergência. Os herbicidas foram aplicados no estágio V4 (Fehr et al. 1971).

No total foram realizados sete ensaios. Nos ensaios 1 e 2 foram aplicados quatro tratamentos: controle negativo – água (NC); 2,4-D; Gly e Gly+2,4-D. Para o ensaio 3, foram realizados cinco tratamentos: NC; 2,4-D; Gly; Gly+2,4-D e o fungicida trifloxistrobina+tebuconazol (PC). Nos ensaios 4, 5, 6 e 7 foram realizados seis tratamentos: NC; 2,4-D; Glu; Gly; Gly+2,4-D, PC.

Nos ensaios 1 e 2 as plantas foram cultivadas em casa de vegetação até a aplicação dos tratamentos no estágio V4. No momento de aplicação, as plantas já estavam infectadas espontaneamente por oídio com cerca de 90% de incidência, principalmente nas folhas do terço inferior e, sem sintomas presentes nos terceiros trifólios. Após a aplicação, as plantas do ensaio 1 foram acondicionadas em câmara

de crescimento (Conviron®), com cada tratamento em box separado para evitar a exposição por voláteis e as plantas do ensaio 2 continuaram em casa de vegetação, e os vasos foram delineados inteiramente causualizados.

Nos ensaios 3, 4, 5 e 6, as plantas foram cultivadas em câmara de crescimento até o estágio V4 (Fehr et al. 1971), retiradas, e pulverizadas com os tratamentos e acondicionadas em casa de vegetação. No ensaio 7, as plantas foram cultivadas em câmara de crescimento até o estágio V1, retiradas, e pulverizadas com os tratamentos e acondicionadas em casa de vegetação (Fehr et al. 1971). Desta forma, as plantas no momento da aplicação dos tratamentos estavam livres de qualquer infecção de oídio.

Em câmara de crescimento as plantas foram cultivadas a 28 °C dia e 22 °C noite; umidade relativa de 90%; fotoperíodo de 12 h e intensidade de luz de 650 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estas condições foram utilizadas com intuito de favorecer o desenvolvimento das plantas. Em casa de vegetação a temperatura variou de 10 a 35 °C, umidade relativa de 50 a 85% e fotoperíodo de aproximadamente 12 h. As temperaturas externas da casa de vegetação são apresentadas na Figura S1. O ensaio 1 e 2 foi conduzido de fevereiro a abril de 2020; ensaio 3: julho a setembro de 2020; ensaio 4: agosto a outubro de 2020; ensaio 5: outubro a dezembro de 2020; ensaio 6: março a maio de 2021; ensaio 7: maio a agosto de 2021.

2.3 Infecção com oídio

Nos ensaios 1 e 2 a infecção ocorreu de forma espontânea dentro da casa de vegetação, antes da aplicação dos tratamentos.

Para os ensaios 3, 4, 5, 6 e 7, a fim de evitar qualquer infecção espontânea, as plantas foram cultivadas desde a semeadura em câmara de crescimento. Após 24 h da aplicação dos tratamentos, as plantas foram expostas ao inóculo do fungo. Para isso, foram adicionados seis vasos contendo duas plantas de soja infectadas com oídio, a uma altura de 50 cm acima dos vasos que receberam os tratamentos, a fim de facilitar a deposição natural do inóculo nas folhas, conforme metodologia adaptada de Gonçalves et al. (2002). Foram utilizadas para a fonte de inóculo plantas da cultivar BMX Potencia RR®, em estágio R1 (Fehr et al. 1971), que foram cultivadas em casa

de vegetação em vasos de 5 L preenchidos com solo, que haviam sido naturalmente infectadas com oídio, apresentando uma severidade > 90%.

2.4 Aplicação foliar dos tratamentos

A aplicação foi realizada em plantas de soja E3 com cerca de 35 dias após a emergência em estágio vegetativo V4 (Fehr et al. 1971). Para a aplicação se utilizou um pulverizador costal pressurizado de CO₂, munido com uma barra de aplicação de um metro de largura equipada com duas pontas do tipo AIXR110015 (TeeJet® Technologies - Spraying Systems, Wheaton, IL). O equipamento foi calibrado para distribuir 200L ha⁻¹, a pressão constante de 3kPa, trabalhando a uma altura de 50 cm do topo da planta, e uma velocidade de 1 m/s, atingindo uma faixa aplicada de 50 cm de largura por ponta de pulverização. As temperaturas no momento das aplicações variaram de 18 a 22° C e umidade relativa do ar de aproximadamente 70%. Os volumes de calda e as doses descritas, seguiram recomendação de bula para aplicações em pós emergência da soja tolerante em estágio V4 (Fehr et al. 1971), o recomendado para o controle de plantas daninhas. No caso do fungicida, foram seguidas as recomendações de bula para o controle de oídio na soja.

As plantas foram retiradas da câmara de crescimento após 2 h de fotoperíodo ligado, a fim das folhas apresentarem nictinastia aberta para melhorar a cobertura das pulverizações. Para o ensaio em casa de vegetação, seguiu-se os mesmos cuidados para a pulverização, sendo aplicado após 2 h de luz natural ao amanhecer. Os vasos foram colocados em linha e cada tratamento foi aplicado separadamente para evitar exposição cruzada, por deriva e/ou volatilização. Após cada aplicação, as plantas de cada tratamento foram transferidas e acondicionadas em box separados em câmara de crescimento, a fim de evitar problemas de contaminação por volatilização. Em casa de vegetação, foi tomado o cuidado de deixar plantas separadas. Entre as aplicações, o equipamento de pulverização passou por lavagem com etanol 70%, seguido por um enxágue triplo com água para garantir a retirada de resíduos do tratamento anterior.

Na câmara de crescimento, após os tratamentos, as plantas foram acondicionadas a temperatura de 25 °C dia e 18 °C noite, fotoperíodo de 12 h, umidade relativa de 90% e intensidade de luz de $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estas condições foram utilizadas com intuito de favorecer o desenvolvimento do oídio. Na casa de vegetação

não havia condições controladas, a temperatura variou de 10 a 35 ° C, umidade de 50 a 85% e fotoperíodo de aproximadamente 12 h.

2.5 Avaliação da doença e análise estatística

A severidade do oídio foi avaliada com auxílio de escala diagramática com 10 níveis, que correspondem a porcentagem de área foliar com sintomas da doença (Maciel et al. 2019), onde 0%, significou ausência de sintomas e, 100% toda área foliar com sintomas. Foram avaliados os três folíolos do terceiro trifólio de 6 plantas por tratamento para estimar a severidade média.

A avaliação para os ensaios 1 e 2 ocorreu aos 15 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). Nos ensaios 3, 4, 5 e 6 a avaliação foi realizada aos 10, 15, 20, 30, 40 e 50 DAA. Para o ensaio 7, foram tiradas fotos após a inoculação, para se visualizar os sintomas. Para a análise estatística, foi utilizada um valor de severidade para cada planta por data de avaliação, considerando seis repetições por tratamento.

Os valores de severidade dos ensaios 1 e 2, foram analisados quanto a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos usando o teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). Quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD), ao valor de probabilidade ($P \leq 0.05$), utilizando o pacote *ExpDes.pt* no *software* R (Ferreira et al. 2014).

Com os dados de severidade da doença dos ensaios 3, 4, 5 e 6 foram efetuados os cálculos da área abaixo da curva de progresso da severidade (AUDPC), de acordo com a seguinte fórmula: $AUDPC = \sum^{n-1} [(Y_{i+1} + Y_i) * 0,5] * (T_{i+1} - T_i)$, onde n representou o número de observações, y a severidade da doença e t o intervalo de tempo entre duas avaliações consecutivas (Shaner e Finney, 1977; Campbell e Madden, 1990). Os dados dos valores de AUDPC foram submetidos aos mesmos testes descritos acima no *software* R.

Para os ensaios 4, 5 e 6, foi plotada a curva do progresso da doença para cada um dos ensaios realizados e uma curva da média dos três ensaios, por meio do *software* R. No ensaio 7, foram feitos registros com fotos aos 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 DAA, e criado uma única figura com o *software* Inkscape®, para visualizar o efeito dos tratamentos ao decorrer dos dias.

3 RESULTADOS

3.1 Ensaio 1, 2 e 3

Os herbicidas Gly e Gly+2,4-D foram eficientes na redução da severidade de oídio da soja, em ambos os ambientes (câmara de crescimento e casa de vegetação) e datas de avaliação (15 e 30 DAA), diferindo estatisticamente ($P \leq 0.05$) do NC. Já a aplicação do 2,4-D não diferiu ($P > 0.05$) em ambos os ensaios e avaliações do tratamento NC (Tabela 1).

O Gly+2,4-D foi o tratamento que proporcionou a menor severidade observada nesses ensaios, com uma redução na avaliação dos 30 DAA de 85% para o ensaio 1 e 73% no ensaio 2, em comparação com o NC. Para o Gly, a redução foi de 41% no ensaio 1 e 47% no ensaio 2, na avaliação dos 30 DAA quando comparado com o NC. No ensaio 2, a severidade média foi maior, independente do tratamento, quando comparado com o ensaio 1 (Tabela 1).

Da mesma forma como nos ensaios anteriores, o herbicida Gly+2,4-D foi o que proporcionou a menor AUDPC, seguido pelo Gly no ensaio 3 (Tabela 1). Ambos diferiram estatisticamente entre si ($P \leq 0.05$) e, em comparação com NC. A redução da AUDPC foi de 83% (Gly+2,4-D) e 69,7% (Gly). O 2,4-D foi ineficiente na inibição da doença, com desempenho similar ao NC. No entanto, no ensaio 3, o fungicida incluído (PC) mostrou-se mais eficiente que os herbicidas, com inibição de 99,54%.

3.2 Ensaio 4, 5, 6 e 7

Os herbicidas Gly+2,4-D, Gly e Glu apresentaram atividade inibitória para oídio, pois reduziram significativamente ($P \leq 0.05$) a AUDPC. O Gly+2,4-D apresentou a maior redução da severidade da doença, seguido do Gly e Glu, sendo que ambos diferiram estatisticamente ($P \leq 0.05$) entre si (Tabela 2). Todos os tratamentos apresentaram resultados similares nestes ensaios, exceto para o ensaio 4, onde o 2,4-D apresentou AUDPC estatisticamente diferente ($P \leq 0.05$) do tratamento NC. Nas demais repetições o 2,4-D apresentou resultado similar ao NC, sem efetividade de controle.

O resultado das médias da AUDPC dos 3 ensaios, confirmam os resultados anteriores. A AUDPC de todos os tratamentos diferiu estatisticamente ($P \leq 0.05$) do controle negativo, exceto o 2,4-D que apresentou desempenho similar. O tratamento com fungicida (PC) foi o mais eficiente na inibição da doença, com uma eficiência de 97%. Para os demais tratamentos com herbicidas testados, a eficiência foi de 88.28% (Gly+2,4-D); 74.06% (Gly) e 64.41% (Glu) (Tabela 2). Na Figura 1, estão apresentadas as curvas de progresso da doença plotadas com as médias dos três ensaios 4, 5 e 6. O tratamento 2,4-D apresentou uma curva similar ao NC ao longo das avaliações. O Glu e Gly, na avaliação de 50 DAA reduziram a curva do progresso da doença em aproximadamente 50% se comparado com NC, e o Gly+2,4-D acima de 75%. No entanto, ambos tratamentos foram inferiores ao PC.

Na Figura 2, são apresentadas fotos do ensaio 7 ao longo dos dias de registro após a realização dos tratamentos. Verifica-se que os herbicidas Glu, Gly e Gly+2,4-D e 2,4-D causaram inibição do oídio, que se reduz gradativamente com o passar dos DAA. O PC foi o que apresentou maior atividade inibitória e por maior período de dias, seguido do Gly+2,4-D, Gly, Glu e 2,4-D. Para este último, se observa rápida perda de atividade de inibição, que é totalmente reduzida após 20 DAA. Para todos os tratamentos que apresentaram efeito inibitório da doença, esse efeito foi observado para as folhas que receberam a pulverização, e também para as folhas superiores, ou seja, que não receberam a aplicação. Além da atividade inibitória dos tratamentos, pode-se observar efeito fitotóxico nas plantas pelos tratamentos Glu, Gly e Gly+2,4-D. O Glu e Gly causou sintoma predominante de clorose e redução inicial do desenvolvimento, com atraso na emissão do 1º trifólio. Estes sintomas nas plantas foram minimizados aos 15 a 20 DAA. O Gly+2,4-D causou rápida necrose de alguns pontos isolados do limbo foliar. Esse sintoma foi visualizado já no primeiro dia após a aplicação. Verifica-se o normal desenvolvimento das plantas após 20 a 30 DAA. Os demais tratamentos não foram observados efeitos de fitotoxicidade.

Na Figura S2, estão apresentadas as curvas de progresso da doença plotadas para cada um dos ensaios (4, 5 e 6) separadamente. Observa-se comportamento similar dos tratamentos nos ensaios, no entanto, a severidade máxima variou de acordo com as condições ambientais, em especial a variação de temperatura (Figura S1). Além disso, verifica-se que os herbicidas Gly+2,4-D, Gly e Glu apresentam atividade de inibição do oídio por até 50 DAA ou mais, mas em condições favoráveis

para a doença, após 30 DAA se observa que essa eficiência diminuiu consideravelmente (Figura S2 - C).

4 DISCUSSÃO

Os herbicidas Gly, Glu e Gly+2,4-D foram eficientes na redução da severidade de oídio. Foi também observado sinérgico da mistura do 2,4-D ao Gly no controle desta doença, e maior efeito residual. O 2,4-D isolado foi ineficiente para reduzir a doença. Do mesmo modo, não se observou aumento da doença pela utilização de quaisquer um dos tratamentos com herbicidas.

Gly sal isopropilamina foi descrito eficiente no controle de oídio em soja com única tolerância (RR) (Silva, 2016), corroborando com o nosso resultado para outro sal de Gly - dimetilamina, aplicado em soja com tripla tolerância – E3. Gly também foi eficiente contra outros fungos biotróficos em culturas RR: na soja - *Phakopsora pachyrhizi*, trigo - *Puccinia striiformis* f. sp. tritici e *Puccinia triticina*, na alfafa - *Uromyces striatus* (Feng et al. 2005; Feng et al. 2008; Samac & Foster-Hartnett, 2012).

Uma possível explicação para o Gly ter reduzido o oídio, nesse estudo, é devido a sua ação de controle direta e indireta contra o patógeno. O Gly atua na inibição da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPs) de plantas; que também está presente em fungos (Kruse, Trezzi e Vidal, 2000; Feng et al. 2005). A inibição afeta a rota metabólica do ácido chiquímico, que se relaciona na defesa induzível de plantas a patógenos (Altman e Campbell, 1977; Hammond-Kosack & Jones, 2000; Arcuri et al. 2004). Esta rota também se relaciona com a produção de ácido salicílico, que mesmo não sendo antimicrobiano, atua sinalizando a defesa da planta (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Plantas de soja RR expostas ao Gly apresentam altas concentrações de etileno (Einhardt et al. 2020). É descrito que o etileno possa induzir a defesa da planta contra patógenos biotróficos, como *Plasmopara viticola* (Guerreiro et al. 2016). Ainda é relatado que o Gly induz a síntese e acúmulo de gliceolina, que é uma fitoalexina em plantas de soja, e resulta no aumento da resistência a doenças (Holliday & Keen, 1982; Keen et al. 1982). Possivelmente, outros herbicidas com diferentes mecanismos de ação também possam estimular mecanismos de defesa vegetal e atuar em alguma enzima do fungo *E. diffusa*, reduzindo a ocorrência da doença, como foi observado para os herbicidas Gly, Glu e Gly+2,4-D.

O herbicida Glu também reduziu a severidade de oídio em nosso estudo, podendo ser uma importante ferramenta no manejo desta doença. Aplicações de Glu em arroz transgênico tolerante a este herbicida, diminuiu a ocorrência de brusone e mancha marrom, causadas pelos fungos *Magnaporthe oryzae* e *Cochliobolus miyabeanus* (fase sexual de *Bipolaris oryzae*) (Ahn, 2008). O herbicida impediu a formação de apressórios, sem afetar germinação de conídios de ambos os patógenos. Em ensaios *in vitro*, o Glu diminuiu o crescimento micelial de ambos os patógenos; e em planta, ativou mecanismos de defesa, favorecendo as transcrições de genes relacionados à patogenicidade, como as proteínas PR, e o acúmulo de peróxido de hidrogênio no arroz transgênico e também em *Arabidopsis thaliana* com o gene de tolerância *Bar* (Ahn, 2008). O herbicida bialofos, um análogo do glufosinato de amônio, inibiu o crescimento e esporulação de outra espécie causadora de oídio - *Erysiphe graminis*. Por meio de microscopia, foi observado que a maior parte da atividade da enzima glutamina sintetase parece ser expressa nos haustórios do fungo (Chaure et al. 2000). Sabe-se também que esse herbicida pode inibir a atividade da glutamina sintetase em fungos, similar ao que ocorre em plantas (Kortekamp, 2011).

O Glu também inibiu o patógeno biotrófico *Plasmopara viticola*, causando restrição no desenvolvimento do micélio intercelular, inibindo formação de densa rede de hifas, além de reduzir sua esporulação (Kortekamp, 2008, 2010). Em pré-inoculação a proteção aumentou quando intervalos de tempo entre o tratamento e a inoculação aumentaram, o que indica ativação dos mecanismos de defesa da planta de videira não tolerante (Kortekamp, 2010). Devido a *P. viticola* ser é um patógeno biotrófico, assim como *E. diffusa*, acredita-se que o herbicida apresente a mesma atividade de inibição evidenciado em nosso estudo.

Ainda para videiras não tolerantes, em aplicações de campo, o Glu apresentou impacto genostático quase completo na esporulação de *Penicillium expansum*, quando testado na concentração 500 vezes mais diluída do que a dose recomendada para uso (Albrecht & Kortekamp, 2009). Foi descrito ainda efeito hormético dessa dose, com aumento no teor de clorofila nas folhas, sem qualquer fitotoxicidade visível (Kortekamp, 2008, 2010). Um outro fato interessante sobre o mecanismo de ação é que, quando adicionado Glu no processo de vinificação, o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foi inibido. O herbicida bloqueia a glutamina sintetase, que inibe parcialmente a via TORC1 do fungo, responsável pela

detecção de nutrientes, causando restrição alimentar e defeitos na parede celular, tornando as células redondas e aumentadas (Shimizu et al. 1997; Vallejo et al. 2017).

A inibição da glutamina sintetase na planta pode criar ambiente desfavorável para o desenvolvimento do patógenos fúngicos, devido alterações no pH, menor quantidade de aminoácidos, níveis tóxicos de amônia e restritos de nitrogênio no tecido das plantas, aumento na produção de ácido cinâmico, produtos fenólicos e fitoalexinas, sendo tóxicos para bactérias e fungos (Hoagland et al. 2018; Sardrood & Goltapeh, 2018). Altos níveis de amônia parecem favorecer fungos necrotróficos, mas podem suprimir o crescimento de patógenos biotróficos (Kortekamp, 2011). A glutamina sintetase e outras enzimas afetadas pelo Glu causam acúmulo de espécies reativas de oxigênio - ROS (Takano et al. 2021) e também está envolvida na expressão dos genes relacionados a biossíntese de proteínas e produção de energia, que parecem ser importantes durante a germinação e início de uma infecção biotrófica ou hemibiotrófica (Shan et al. 2004). Essas podem ser as causas da inibição observada em nosso estudo.

É descrito ainda que a inibição da glutamina sintetase pelo Glu é rápida em *Amaranthus palmeri*, chegando a 95% de inibição em 2 h após a aplicação. No entanto, a inibição e consequente acúmulo de ROS sofre influência de condições ambientais, como a luz, temperatura e a umidade no momento da aplicação. Além disso, é bem conhecido que a aplicação de Glu no início da manhã, final da tarde, ou mesmo em dias nublados reduz a inibição da glutamina sintetase e com isso não leva ao acúmulo de ROS (Petersen & Hurle, 2001; Kumaratilake & Preston, 2005; Aliverde et al. 2020; Takano et al. 2020a; Takano et al. 2020b; Takano et al. 2021). Nestas condições, a concentração do Glu é diminuída dentro das células ao longo das horas após a aplicação (Takano et al. 2021). Devido a essas informações do Glu, novas investigações devem ser conduzidas para elucidar o mecanismo envolvido no controle de doenças e, se em aplicações noturnas a atividade inibitória de doenças também é reduzida.

Em nosso estudo, observamos a ação de inibição da doença de forma preventiva e curativa nas folhas que receberam as aplicações; o efeito sistêmico dos tratamentos para novas folhas que não receberam a aplicação e; também efeito residual, pela atividade inibitória se manter ao decorrer de DAA. Na Figura 2 fica evidente essas ações e, cabe ainda frisar que os tratamentos foram pulverizados quando as plantas apresentavam apenas as folhas unifolioladas expandidas e, se

observa proteção para as folhas superiores. Pelo efeito sistêmico e residual observado, aplicações preventivas podem ser interessantes por promover a proteção da planta. Para o Gly aplicado em soja RR, é descrito que a translocação desse herbicida é maior a 35° C para tecidos meristemáticos e folhas acima das tratadas, enquanto a 15 °C a translocação é maior para brotos e folhas abaixo da que foi tratada (Pline et al. 1999). Para o Glu, a 15 e 25 °C, a translocação é semelhante, e por ser um herbicida altamente solúvel em água, sua translocação ocorre principalmente via apoplasto ou xilema, assim tende a acumular mais herbicidas em folhas velhas do que em tecidos meristemáticos e folhas jovens (Pline et al. 1999; Takano et al. 2020c). Seria relevante investigar essas relações com a ocorrência da doença em situações de campo e em diferentes cultivares.

Foi observado que a atividade de inibição da doença com o uso dos herbicidas é transitória, indicando redução de eficiência com o passar do tempo, mesmo em condições de casa de vegetação. Mesmo assim, se infecções do patógeno forem suprimidas no início do seu desenvolvimento, isso pode resultar em uma redução substancial da doença ao longo do ciclo de cultura, pois se trata de um patógeno policíclico, que produz esporos a cada 7 a 10 dias após a infecção inicial (Picinini & Fernandes, 1998). Para o Gly, foi relatado que o efeito inibitório é transitório devido a diminuição da concentração do glifosato nas folhas, pela diluição e quebra da molécula nos tecidos em crescimento da planta com o passar do tempo, chegando a um nível não inibitório (Anderson & Kolmer, 2005; Feng et al. 2008; Samac & Foster-Hartnett, 2012). Similar ao observado em nossos ensaios para herbicidas Glu e Gly+2,4-D.

O tratamento Gly+2,4-D apresentou efeito sinérgico na inibição do oídio, confirmando que a mistura de herbicidas pode alterar comunidades biológicas (Rose et al. 2016). Herbicidas em mistura podem ser benéficos devido ao maior espectro de controle de organismos-alvo, reduzindo os custos e sendo uma ferramenta anti-resistência de plantas daninhas (Gazziero, 2015), mais ainda, neste caso, de patógenos. O 2,4-D pode ter vários locais de ação e levar ao desequilíbrio hormonal vegetal, interferindo no metabolismo de ácidos e a síntese de proteínas, causando fraqueza das paredes celulares e divisões celulares inúteis (Mousavi et al. 2004). Aplicações de 2,4-D estimulam a produção de etileno em plantas (Raghavan et al. 2006), como também é estimulado pelo Gly (Einhardt et al. 2020). É descrito que o

etileno pode induzir a defesa da planta contra patógenos biotróficos (Guerreiro et al. 2016).

No uso de herbicidas em mistura pode ocorrer efeito sinérgico ou antagônico, devido a alteração na absorção, translocação e no metabolismo da planta (Han et al. 2013; Peterson et al. 2016; Ou et al. 2018). Para a mistura Gly+2,4-D foi descrito que o 2,4-D reduz a taxa de absorção do Gly e a sua translocação em plantas (Figueiredo et al. 2017; Li et al. 2020). A absorção de Gly pela folha atinge até 80% dentro de 24 h, sem aumento até 72 h, e 45% do Gly é translocado para o caule e folhas não tratadas da planta daninha *Echinochloa colona*. Quando aplicado Gly+2,4-D, a absorção reduz em até 20% e a translocação em até 12%, se comparado com a aplicação do Gly isolada (Li et al. 2020). Além disso, é especulado a presença de outros mecanismos ainda não bem esclarecidos, como os químicos com a troca de cátions, interações físicas e fisiológicas (Flint & Barrett, 1989; Nalewaja & Matysiak, 1992; Figueiredo et al. 2017). Em biótipos da planta daninha *E. colona* suscetíveis ao Gly, o antagonismo foi menor quando comparado com biótipos resistentes, em aplicações em taxas letais (Li et al. 2020). O efeito sinérgico observado em nosso estudo pode ser devido a um efeito antagônico da mistura na redução da absorção e translocação na planta, com isso, uma maior concentração possa estar presente nas folhas mais velhas que receberam a aplicação, devido a redução na translocação em tecidos meristemáticos. É possível que o Gly permaneça disponível em maior quantidade externa e internamente no limbo foliar e, essa maior concentração atue como um fungicida de contato ou sistêmico no controle do oídio.

A aplicação do Glu e Gly em estágio V1 (Figura 2), causou efeito de clorose nos primeiros DAA, que desapareceram entre 15 a 20 DAA. Foi relatado que o Glu e Gly causam redução do teor de clorofila em soja tolerante (Reddy et al., 2004; Takano et al. 2020c). Para o Glu a redução da clorofila é maior em temperatura baixa (15 °C), e para o Gly em temperatura mais alta (35° C) (Pline et al. 1999). A redução da clorofila no caso do Gly é conhecida como “*yellow flashing*” (Zobiolo et al. 2012), que é associado a efeitos secundários do herbicida, como acúmulo de ácido chiquímico nos meristemas das plantas e a degradação do Gly em ácido aminometilfosfônico – AMPA (Reddy et al. 2004; Ding et al. 2011). Para o Glu a clorose é devido ao acúmulo de ROS (Takano et al, 2021), que por sua vez é tóxica para fungos.

Em nosso estudo, o herbicida 2,4-D foi ineficiente na inibição da doença, com desempenho similar ao controle negativo. Os trabalhos sobre a inibição de

microrganismos por ação deste fungicida são muito inconsistentes. O 2,4-D aplicado em doses convencionais (0.5, 1, 2 e 4 kg ea ha⁻¹) reduziu a presença de bactérias e aumentou os fungos (Devi et al. 2008). Da mesma forma, foi observado redução de bactérias do solo, mas não para fungos (Breazeale e Camper, 1970). Outros estudos não detectaram nenhuma atividade de inibição, similar ao observado em nosso estudo (Macur et al. 2007; Zhang et al. 2010).

Dunn & Gaynor (2020) relataram que a severidade de oídio na soja variou entre as safras de diferentes anos da mesma forma como observado em nosso estudo. Em ambos os casos, a possível explicação é a diferença de temperatura e umidade durante a condução dos experimentos. A temperatura e a umidade são fatores limitantes para este fungo, e sua ocorrência na cultura da soja é favorecida por temperaturas amenas na faixa de 18 a 24 °C, baixa umidade (Barcelos et al. 2018; Roese et al. 2020) e baixa intensidade luminosa (Roese et al. 2020). Temperaturas superiores a 30 °C inibem o desenvolvimento desta doença (Balardin, 2002). Da mesma maneira, em temperaturas mais elevadas e condições hídricas satisfatórias, mais herbicida é absorvido e translocado. Temperaturas mais amenas podem manter o produto por mais tempo no tecido foliar.

Entretanto, considerando os sete ensaios, de acordo com nossos resultados, os herbicidas comerciais Gly, Glu e Gly+2,4-D apresentaram potencial de controle do oídio quando aplicados em doses recomendadas em bula para controle de plantas daninhas, como a buva - *Conyza* spp. e capim-amargoso - *Digitaria insularis*, aplicados em pós emergência da soja E3. Esses herbicidas podem ser ferramentas estratégicas no manejo da cultura da soja E3, pois os momentos de controle de plantas daninhas em pós-emergência da soja coincidem com o início da ocorrência do oídio. Estas aplicações podem levar ainda à redução dos custos de controle e danos ambientais, com o menor número de aplicações. Cabe salientar que nossos resultados foram obtidos em condições de casa de vegetação, sem molhar as folhas das plantas após a aplicação dos tratamentos, assim, em outras condições, como as de campo, a atividade inibitória para a doença pode ser reduzida. Entendemos a necessidade de estudos de campo, pois nessas condições, os fatores climáticos (temperatura, luz, umidade) interagem entre o herbicida, o patógeno e a planta, e precisam ser mais estudados.

Além disso, novas pesquisas que avaliem o uso de agrotóxicos em mistura, não apenas de herbicidas em misturas comerciais, mas também com a associação de

fungicidas, e sua interação com patógenos em culturas tolerantes aos herbicidas são cada vez mais necessárias, devido o alto número de plantas daninhas e patógenos que apresentam resistência, atrelado ao baixo número de moléculas disponíveis para controle. Estes estudos podem vir a fomentar a obtenção de novos produtos em mistura comerciais – herbicidas/fungicidas, ou mesmo de outros sais que apresentam efeito aditivo e/ou sinérgico no manejo de doenças. Esses *insights* merecem atenção das empresas, podem incentivar pesquisas para novos usos de moléculas já existentes, e abrem um campo inteiramente novo de pesquisa, com repercussões promissoras não apenas na agricultura, mas também na medicina e na biotecnologia.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001. O primeiro autor agradece ao Instituto Federal Catarinense (IFC) Concórdia/SC – Brasil pelo afastamento integral para realização do doutorado. O terceiro e quarto autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Brasil pela bolsa de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Ahn, I. P. 2008. Glufosinate ammonium induced pathogen inhibition and defense responses culminate in disease protection in bar-transgenic rice. *Plant Physiol.* 146:213–227.
- Albrecht, M., Kortekamp, A. 2009. The in vitro effect of the herbicide Basta® (Glufosinate ammonium) on potential fungal grapevine pathogens. *Eur. J. Hortic. Sci.*, 74, 112-117, ISSN 1611-4426.
- Aliverdi, A., Ahmadvand, G., Emami-Namivandi, B. 2020. Weed control of glufosinate, oxyfluorfen, and paraquat as affected by the application time of day. *Planta Daninha.* 38, e020221613.
- Altman, J., Campbell, C. L. 1977. Effect of herbicides on plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 15, 361e385.

- Anderson, J. A. and Kolmer, J. A. 2005. Rust control in glyphosate tolerant wheat following application of the herbicide glyphosate. *Plant Dis.*, 89:1136-1142.
- Arcuri, H. A.; Canduri, F.; Pereira, J. H.; Da Silveira, N. J. F.; Camara Jr., J. C.; De Oliveira, J. S.; Basso, L. A.; Palma, M. S.; Santos, D. S.; De Azevedo Jr, W. F. 2004. Molecular models for shikimate pathway enzymes of *Xylella fastidiosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.320, p.979.
- Balardin, R.S. Doenças da soja. Santa Maria: UFSM, 2002.
- Barcelos, J. P. Q., Reis, H. P. G., Godoy, C. V., Gratao, P. L., Furlani, Junior, E., Putti, F. F., Campos, M., Reis, A. R. 2018. Impact of foliar nickel application increase urease activity enhances antioxidant metabolism, and control powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) in soybean plants. *Plant Pathol.* 67: 1502–1513.
- Bonny, S. 2016. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact. *Environ. Manage.*, 57, 31–48, <https://doi.org/10.1007/s00267-015-0589-7>.
- Breazeale, F. W., Camper, N. D. 1970. Bacterial, fungal, and actinomycete populations in soils receiving repeated applications of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and trifluralin. *Appl. Microbiol.*, 19, 379–380.
- Brookes, G., Barfoot, P. 2014. Economic impact of GM crops: The global income and production effects 1996–2012. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain.* 5:37–47.
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990. Monitoring epidemics: diseases. In: Introduction to plant disease epidemiology. New York: J. Wiley, cap.6, p.107-128.
- Chaure, P., Gurr, S., Spanu, P. 2000. Stable transformation of *Erysiphe graminis* an obligate biotrophic pathogen of barley. *Nat Biotechnol.* 18, 205–207. <https://doi.org/10.1038/72666>.
- Devi, K. M. D., Beena, S., Abraham, C. T., Durga Devi, K. M. 2008. Effect of 2,4-D residues on soil microflora. *J. Trop. Agric.* 46, 64–66.
- Ding, W., Reddy, K. N., Zablotowicz, R. M., Bellaloui, N., Bruns, H. A. 2011. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean

- to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. *Chemosphere* 83, 593–598. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.008.
- Duke, S. O. 2018. Glyphosate: the world's most successful herbicide under intense scientific scrutiny. *Pest Manag. Sci.*, 74: 1025–1026.
- Dunn, M. W., Gaynor, L. G. 2020. Impact and Control of powdery mildew on Irrigated Soybean Varieties Grown in Southeast Australia. *Agron.*, 10, 514. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040514>.
- Einhardt, A. M., Ferreira, S., Hawerth, C., Valadares, S. V., Rodrigues, F. Á. 2020. Nickel potentiates soybean resistance against infection by *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Pathol.*, 69(5):849–859. doi:10.1111/ppa.13169.
- Fartyal, D., Agarwal, A., James, D. Borphukan, B., B., Ram, B., R., Sheri, V., S., Agrawal, P. K., Achary, Mohan, M. A., Reddy, M. K. 2018. Developing dual herbicide tolerant transgenic rice plants for sustainable weed management. *Sci. Rep.*, 8, 11598. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29554-9>.
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., Pennington, J. S. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.*, 11, 929e931.
- Feng, P. C. C., Baley, G. J., Clinton, W. P., Bunkers, G. J., Alibhai, M. F., Paulitz, T. C., Kidwell, K. K. 2005. Glyphosate inhibits rust disease in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 48, 17290e17295. 
- Feng, P. C. C., Clark, C., Andrade, G. C., Balbi, M. C., Caldwell, P. 2007. The control of Asian rust by glyphosate in glyphosate-resistant soybeans. *Pest Manage. Sci.*, 64:353-359.
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P. Nogueira, D. A. 2014. ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Applied Mathematics*, 5, 2952-2958. <http://dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280>.
- Fialho, C. M. T., Santos, J. B., Freitas, M. A. M., França, A. C., Silva, A. A., Santos, E. A. 2011. Fitossociologia da comunidade de plantas daninhas na cultura da soja transgênica sob dois sistemas de preparo do solo. *Sci. Agrar.*, Curitiba, v.12, n.1, p. 009-017.

- Figueiredo, M. R. A., Zsögön, A., Tornisielo, V. L., Peres, L. E. P., Silva, W. T. L., Fadin, D. A., Alcarde, R., Gaines, T., Christoffoleti, A. P. J. 2017. *Global Herbicide Resistance Challenge*, 148.
- Flint, J., Barrett, M. 1989. Antagonism of Glyphosate Toxicity to Johnson grass (*Sorghum halepense*) by 2,4-D and Dicamba. *Weed Sci.* 37(5), 700-705. doi:10.1017/S0043174500072660.
- Gazziero, D. L. P. 2015. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. *Planta daninha*, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 83-92.
- Gonçalves, E. C. P.; Mauro, A. O. Di; Centurion, M. A. P. Da C. 2002. Genetics of resistance to powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) in Brazilian soybean populations. *Genet. Mol. Biol.* 339-342, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572002000300015>.
- Green, J. M., Owen, M. D. K. 2011. Herbicide-resistant crops: Utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5819–5829, <https://doi.org/10.1021/jf101286h>.
- Guerreiro, A., Figueiredo, J., Sousa, Silva, M., Figueiredo, A. 2016. Linking jasmonic acid to grapevine resistance against the biotrophic oomycete *Plasmopara viticola*. *Front. Plant Sci.*, 7: 565.
- Hammerschmidt, R. 2018. How glyphosate affects plant disease development: it is more than enhanced susceptibility. *Pest Manag. Sci.*, 74: 1054–1063.
- Hammond-Kosack, K. Jones, J. D. G. 2000. Responses to plant pathogens. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiology, Rockville, pp. 1102-1156.
- Han H., Yu Q., Cawthray G.R., Powles S.B. 2013. Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl. *Pest Manag Sci.* 69: 996– 1000.
- Hartman, G. L., West, E. D., Herman, T. K. 2011. Crops that feed the World 2. Soybean worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Sec.*, 3, 5–17. <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0108-x>.

- Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. Monday, October 18, Available www.weedscience.org (2021).
- Hoagland, R., Boyette, C., Jordan, R. and Stetina, K. 2018. Interaction of Glufosinate and *Colletotrichum truncatum* on Ammonia Levels and Glutamine Synthetase Activity in Hemp Sesbania. *Am. J. Plant Sci.*, 9, 2320-2337. doi: 10.4236/ajps.2018.911168.
- Holliday, M. J., Keen, N. T. 1982. The role of phytoalexins in the resistance of soybean leaves to bacteria: effect of glyphosate on glyceollin accumulation. *Phytopathol.* 72:1470–1474.
- Huber, D. M., Cheng, M. W., Winsor, B. A. 2005. Association of severe *Corynespora* root rot of soybean with glyphosate-killed giant ragweed. *Phytopathol.*, 95, S45.
- Igarashi, S. Oliveira, G. M., Camargo, L. C. M., Falkoski Filho, J., Gardiano, C. G., Balan, M. G. 2010. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. *Arq. Inst. Biol.*, v. 77, n. 2, p. 245-250. doi.org/10.1590/1808-1657v77p2452010.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dados meteorológicos. Acesso em: 10 janeiro de 2022. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br>.
- Johal, G. S., Huber, D. M. 2009. Glyphosate effects on diseases of plants. *Eur. J. Agron.*, 31, 144e152.
- Kao, H. Y., Chung, K. R., Huang, J. W. 2019. Paraquat and glyphosate increase severity of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 85, 23–32. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0823-2>.
- Keen, N. T.; Holliday, M. J., Yoshikawa, M. 1982. Effects of glyphosate on glyceollin production and the expression of resistance to *Phytophthora megasperma* f.sp. glycinea in soybean. *Phytopathol.*, 72, 1468-1470, ISSN 0031-949X.
- Klosowski, A. C., May De Mio, L. L., Miessner, S., Rodrigues, R., Stammers, G. 2015. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Manag. Sci.* v. 72, p. 1211-1215.
- Kortekamp, A. 2008. Knocked out with Basta®! - are herbicides effective against

- downy mildew of grapevine? J Plant Dis Prot XXI:107–112.
- Kortekamp, A. 2010. Side effects of the herbicide glufosinate ammonium on *Plasmopara viticola* and other fungal pathogens. In: Calonnec A, Delmotte F, Emmet B, Gadoury D, Gessler C, Gubler D, Kassemeyer HH, Magarey P, Raynal M, seem R (eds) Proceedings of the 6th international workshop of grapevine downy and powdery mildew, Bordeaux, pp 13–15.
- Kortekamp, A. 2011. Herbicides and environment. InTech, Rijeka, Croatia. <https://library.umac.mo/ebooks/b28109740.pdf>.
- Kruse, N. D.; Trezzi, M. M.; Vidal, R. A. 2000. Herbicidas inibidores da EPSPs: Revisão de literatura. Revista Brasileira de Herbicidas, Londrina, v.1, n.2.
- Kumaratilake, A. R., Preston, C. 2005. Low temperature reduces glufosinate activity and translocation in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Weed Sci.* 53, 10-16.
- Li, J., Han, H., Bai, L., Yu, Q. 2020. 2,4-D antagonizes glyphosate in glyphosate-resistant barnyard grass *Echinochloa colona*. *J Pestic Sci.* doi: 10.1584/jpestics.D20-013.
- Maciel, M. S., Fabiani, G., Delazeri, J.; Praetorius, D. M., Bussolotto, V. P., Machado, R. G., Vieira, Junior, J. A. L., Girardi, L. B., Trevizan, K., Elias, R., Farina, V. A. 2019. Efficiency Of Fungicides For Oidium Control In Soybean Crop. *Rev. Cienc. Agron.*, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 49. <http://dx.doi.org/10.28998/rca.v17i1.6140>.
- Macur, R. E., Wheeler, J. T., Burr, M. D., Inskeep, W. P. 2007. Impacts of 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. *Microbiol. Res.*, 162, 37–45.
- Martinez, D. A., Loening, U. E., Graham, M. C. 2018. Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: a review. *Environ. Sci. Eur.*, 30: 2.
- McDonald, B. A.; Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 40, p. 349-379, 2002.
- Mengistu, A., Reddy, K. N., Bellaloui, N., Walker, E. R., Kelly, H. M. 2013. Effect of glyphosate on *Macrophomina phaseolina* in vitro and its effect on disease severity of soybean in the field. *Crop Prot.*, 54:23–28

- Mousavi, S. K., Zand, E., Saremi, H. 2004. Physiological function and application of herbicides. Zanzan University Press, Zanzan, p. 286.
- Nalewaja, J., Matysiak, R. 1992. 2,4-D and Salt Combinations Affect Glyphosate Phytotoxicity. *Weed Technol.* 6(2), 322-327. doi:10.1017/S0890037X00034801
- Oliver, M. J. 2016. Why we need GMO crops in agriculture. *Mol. Med.*, 111:492–507.
- Ou, J., Thompson, C.R., Stahlman, P.W., Bloedow, N., Jugulam, M. 2018. Reduced Translocation of Glyphosate and Dicamba in Combination Contributes to Poor Control of *Kochia scoparia*: Evidence of Herbicide Antagonism. *Sci Rep* 8, 5330. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23742-3>.
- Petersen, J., Hurle, K., 2001. Influence of climatic conditions and plant physiology on glufosinate-ammonium efficacy. *Weed Research.* 41(1), pp.31-39.
- Peterson, M., McMaster, S., Riechers, D., Skelton, J., Stahlman, P. 2016. 2,4-D Past, Present, and Future: A Review. *Weed Technology*, 30(2), 303-345. doi:10.1614/WT-D-15-00131.1.
- Picinini, E. C., Fernandes, J. M. Doenças da soja: diagnose, epidemiologia e controle. Documentos 42. Passo Fundo: Embrapa CNPT, 1998. 91p.
- Pickett, J. 2016. The essential need for GM crops. *Nature Plants* 2 (6), p. 16078. 10.1038/nplants.2016.78
- Pline, W. A., Wu, J., Hatzios, K. K. 1999. Effects of temperature and chemical additives on the response of transgenic herbicide-resistant soybeans to glufosinate and glyphosate applications. *Pest Biochem Phys.* 65(2), 119-131.
- Raghavan, C., Ong, E., Dalling, M., Stevenson, T. 2006. Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Funct. Integr. Genomics.*, 6, 60–70.
- Reddy, K. N., Rimando, A. M., Duke, S. O. 2004. Amino methyl phosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 16, p. 5139-5143.
- Roese, A. D., Zielinski, E. C., May De Mio, L. L. 2020. Plant diseases in afforested crop-livestock systems in Brazil. *Agric. Syst.*, DOI: 10.1016/j.agsy.2020.102935.
- Rose, M. T, Cavagnaro, T. R., Scanlan, C. A., Rose, T. J., Vancov, T., Kimber, S.,

- Kennedy, I. R., Kookana, R. S., Zwieten, L. V. 2016. Impact of herbicides on soil biology and function. *Adv Agron.*, 136:133– 220. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.11.005>.
- Samac, D. A., Foster-Hartnett, D. 2012. Effect of glyphosate application on foliar diseases in glyphosate-tolerant alfalfa. *Plant Dis.*, 96:1104–1110.
- Santos, F. H. Dos., Santos, L. A., Faria, C. M. D. R. 2018. Translocação de triazóis e estrobilurinas no controle do oídio da soja. *Pesqui. Apl. Agrotec.*, Guarapuava-PR, v.11, n.1, p.87-92, jan-abr., 2018. Doi: 10.5935/PAeT.V11.N1.10.
- Sanyal, D., and Shrestha, A. 2008. Direct effect of herbicides on plant pathogens and disease development in various cropping systems. *Weed Sci.* 56:155-160.
- Sardrood, P. B., Goltapeh, M. E. 2018. Weeds, Herbicides and Plant Disease Management. In: Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 31. *Sustain. Agric. Res.*, vol 31. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94232-2_3.
- Schmitz, H. K., Medeiros, C. Craig, I. R., Stammer, G. 2013. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards Qo inhibitors and demethylation inhibitors, and corresponding resistance. *Pest Manag. Sci.* n. 70, p. 378-388.
- Shan, W., Marshall, J. S., Hardham, A. R. 2004. Gene expression in germinated cysts of *Phytophthora nicotianae*. *Mol. Plant Pathol.*, 5, 317-330, ISSN 1464-6722.
- Shaner, G., Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathol.*, St. Paul, v.67, n.8, p.1051-1056.
- Shimizu, J., Okumura, Y., Yoda, K., Yamasaki, M. 1997. A glutamine synthetase mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows defect in cell wall. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43, 157–162.
- Silva, A. A. P. 2016. **Associação de glyphosate e outros herbicidas com ácido salicílico na ocorrência de oídio, na rota do ácido chiquimico e comportamento na soja RR[®]**. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro - Pr, Guarapuava.
- Simões, K., Hawlik, A., Rehfus, A., Gava, F., Stammer, G. 2017. First detection of a

- SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *J. Plant Dis. Protect.* v. 125, p. 21-26.
- Takano, H. K., Beffa, R., Preston, C., Westra, P., Dayan, F. E. 2020a. A novel insight into the mode of action of glufosinate: How reactive oxygen species are formed. *Photosyn Res.* 144, 361-372.
- Takano, H. K., Beffa, R., Preston, C., Westra, P., Dayan, F. E. 2020b. Glufosinate enhances the activity of protoporphyrinogen oxidase inhibitors. *Weed Sci.* 2020, 68, 324-332.
- Takano, H. K., Beffa, R., Preston, C., Westra, P., Dayan, F. E. 2020c. Physiological factors affecting uptake and translocation of glufosinate. *J. Ag. Food Chem.* 68(10), pp.3026-3032.
- Takano, H. K., Beffa, R.; Preston, C., Westra, P., Dayan, F. E. 2019. Reactive oxygen species trigger the fast action of glufosinate. *Planta.* 249, 1837-1849.
- Takano, H. K., Dayan, F. E. 2021. Biochemical basis for the time-of-day effect on glufosinate efficacy against *Amaranthus palmeri*. *Plants*, 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10102021>.
- Toigo, S., Santos, I., Carnieletto, C.E. Mazaro, S. M. 2008. Controle químico do oídio na cultura da soja. *Sci. Agrar.*, Curitiba, v.9, n.4, p.491-496.
- USDA - United States Department of Agriculture. 2021. Foreign Agricultural Service. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/home>. Acesso: 30/08/2021.
- Vallejo, B., Picazo, C., Orozco, H. Matallana, E., Aranda, A. 2017. Herbicide glufosinate inhibits yeast growth and extends longevity during wine fermentation. *Sci. Rep.* 7, 12414. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12794-6>.
- Zhang, C., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Zheng, Y., Li, J. 2010. Soil microbial communities response to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester. *Eur. J. Soil Biol.*, 46, 175–180.
- Zobiole, L. H. S., Kremer, R. J., Oliveira, R. S., Constantin, J. 2012. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175, 319–330. doi: 10.1002/jpln.201000434.

Tabela 1. Médias de severidade de oídio na soja aos 15 e 30 dias após a aplicação (DAA), nos ensaios 1 e 2; e, área abaixo da curva do progresso da severidade, ensaio 3, Curitiba-PR, 2020.

Tratamentos	Câmara de crescimento		Casa de vegetação		
	Ensaio 1 ^X		Ensaio 2 ^X		Ensaio 3 ^Y
	15 DAA ^Z	30 DAA	15 DAA	30 DAA	AUDPC
NC	42.50 ± 5.24 a	72.50 ± 9.35 a	56.67 ± 9.31 a	81.67 ± 8.16 a	3,132.50 ± 68.28 a
2,4-D	43.33 ± 7.53 a	75.00 ± 6.32 a	60.00 ± 7.07 a	80.00 ± 7.07 a	3,103.75 ± 89.00 a
Gly	9.33 ± 3.77 b	42.50 ± 9.35 b	13.33 ± 4.27 b	43.33 ± 6.83 b	947.92 ± 86.42 b
Gly+2,4-D	0.66 ± 0.82 c	11.17 ± 5.49 c	2.00 ± 0.89 c	22.17 ± 5.49 c	532.50 ± 59.81 c
PC	-	-	-	-	14.16 ± 16.56 d
CV (%) ^W	18.47	13.17	18.39	7.40	4.47

Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva); PC (controle positivo, trifloxistrobina + tebuconazol, Nativo®, Bayer). Ensaio 1 e 2, conduzido de fevereiro a abril de 2020, e ensaio 3 (julho a setembro/2020). Valores representam a média de severidade da doença. Letras iguais na mesma coluna não diferiram estatisticamente pelo teste Tukey HSD (P >0.05). ^XEnsaio com tratamentos curativos. ^YEnsaio preventivo. ^ZDias após aplicação. ^WPercentual do coeficiente de variação.

Tabela 2. Área abaixo da curva do progresso da severidade de oídio na soja, comparando tratamentos com herbicidas, em 3 experimentos realizados em casa de vegetação, Curitiba-PR, 2020/2021.

Tratamentos	Casa de vegetação			
	AUDPC ^X			
	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Média dos ensaios 4, 5 e 6
NC	3,240.00 ± 57.25 a	3,104.16 ± 88.31 a	2,235.00 ± 156.36 a	2,856.67 ± 70.33 a
2,4-D	3,138.33 ± 64.84 b	3,101.67 ± 86.35 a	2,225.83 ± 246.15 a	2,820.83 ± 93.36 a
Glu	549.58 ± 27.72 c	1,365.42 ± 164.00 b	1,136.67 ± 38.72 b	1,016.67 ± 55.69 b
Gly	293.33 ± 61.06 d	1,155.00 ± 117.86 c	768.75 ± 180.39 c	740.83 ± 68.82 c
Gly+2,4-D	147.08 ± 32.76 e	488.33 ± 125.41 d	356.67 ± 121.55 d	334.58 ± 74.35 d
PC	90.00 ± 23.29 e	65.83 ± 40.08 e	91.25 ± 47.11 e	83.33 ± 29.73 e
CV (%) ^Y	3.83	7.15	13.26	5.21

Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Glu (glufosinato de amônio, Finale®, BASF); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva); PC (controle positivo, trifloxistrobina + tebuconazol, Nativo®, Bayer). Ensaio 4, conduzido de agosto a outubro/2020, ensaio 5 (outubro a dezembro/2020), e ensaio 6 (março a maio/2021). Letras iguais na mesma coluna não diferiram estatisticamente pelo teste Tukey

HSD ($P > 0.05$). Todos ensaios receberam tratamentos preventivos. ^xÁrea abaixo da curva do progresso da doença, calculada com os valores de severidade da doença. ^yPercentual do coeficiente de variação.

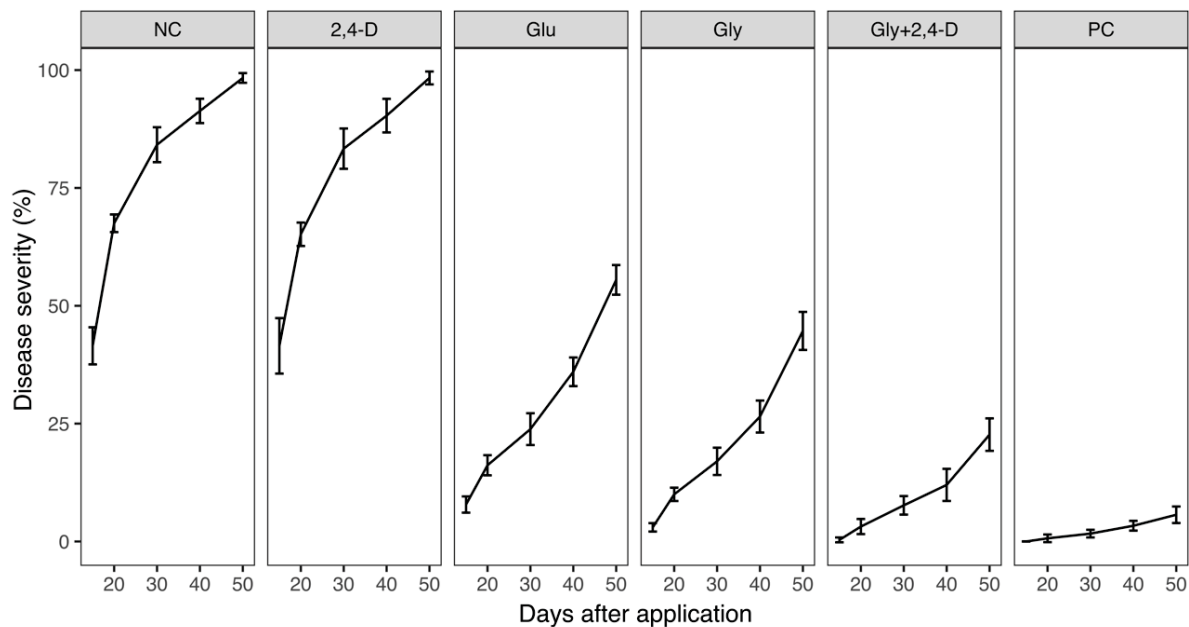
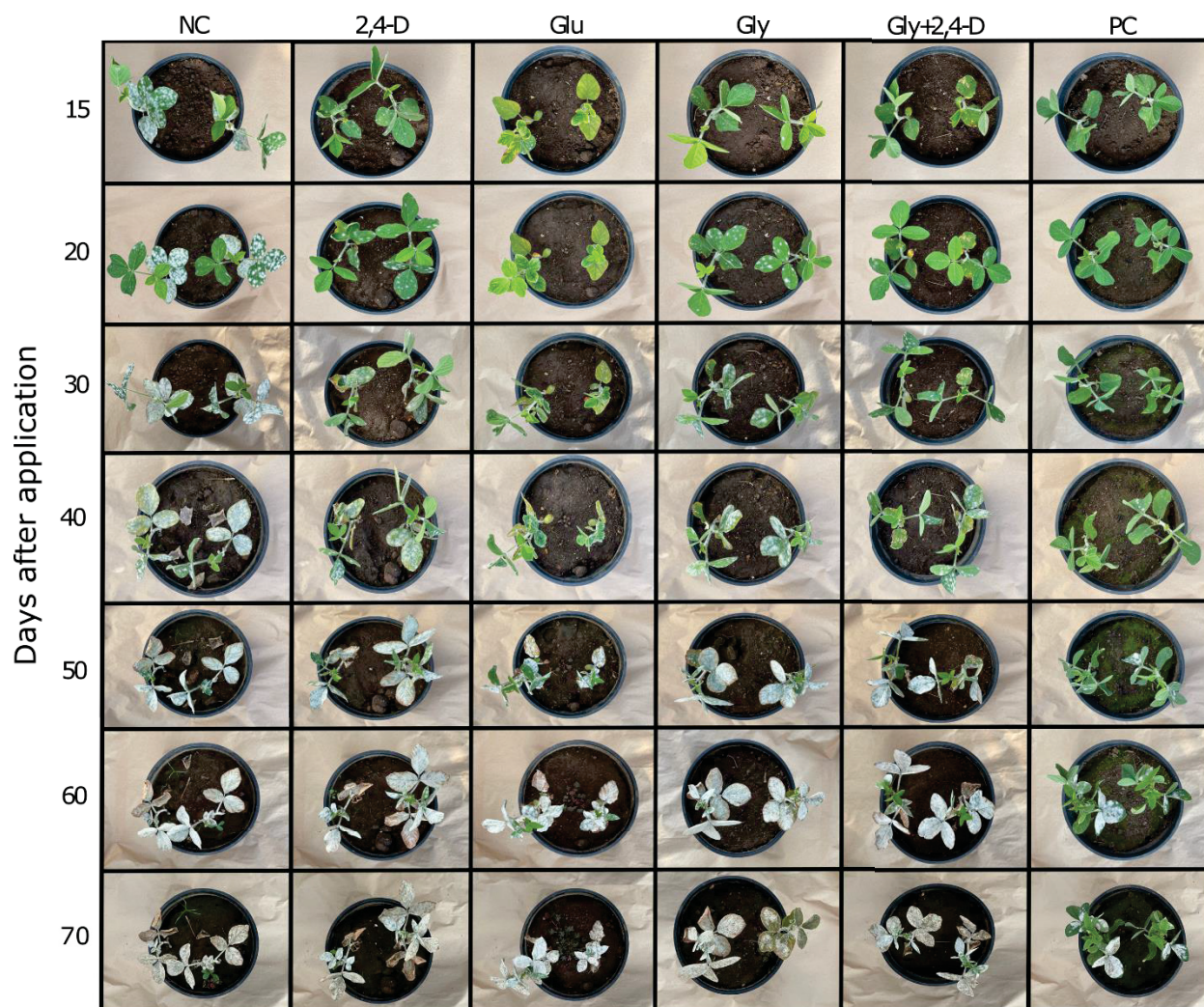


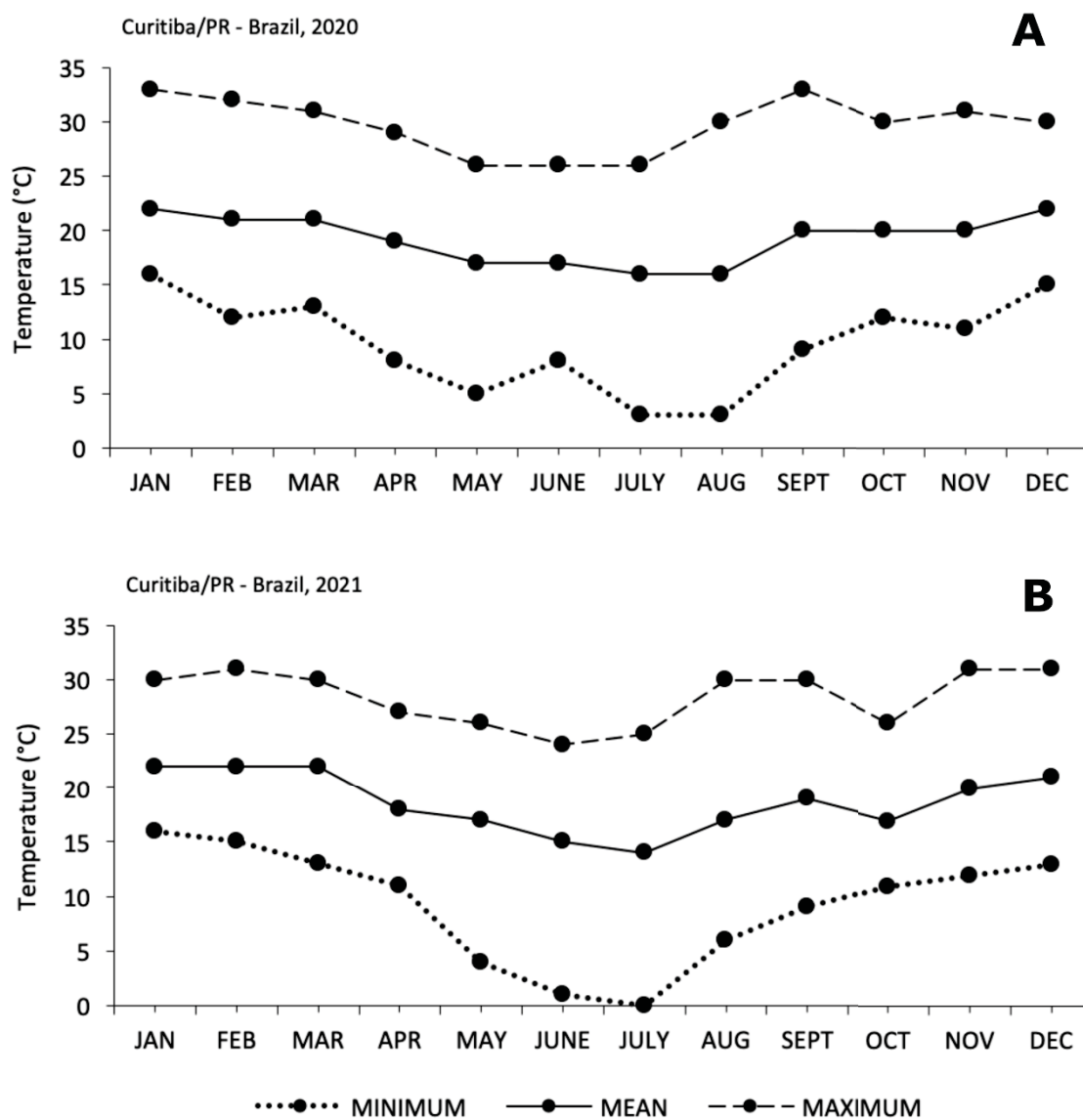
Figura 1. Curvas do progresso da severidade do oídio na soja (média dos ensaios 4, 5 e 6), Curitiba-PR 20/21. Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Glu (glufosinato de amônio, Finale®, Basf); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva); PC (controle positivo, trifloxistrobina + tebuconazol, Nativo®, Bayer).



Fonte: O autor (2021).

Figura 2. Efeito dos tratamentos preventivos com herbicidas no controle de oídio da soja em casa de vegetação (maio – agosto/2021), Curitiba-PR. Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Glu (glufosinato de amônio, Finale®, BASF); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Duo® Colex-D®, Corteva); PC (controle positivo, trifloxistrobina + tebuconazol, Nativo®, Bayer). Tratamentos aplicados em estágio V1 da soja - completo desenvolvimento das folhas unifolioladas.

Material Suplementar



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), 2022.

Figura S1. Temperaturas mínima, média e máxima mensais de Curitiba/PR. **A** – Ano de 2020. **B** – Ano de 2021.

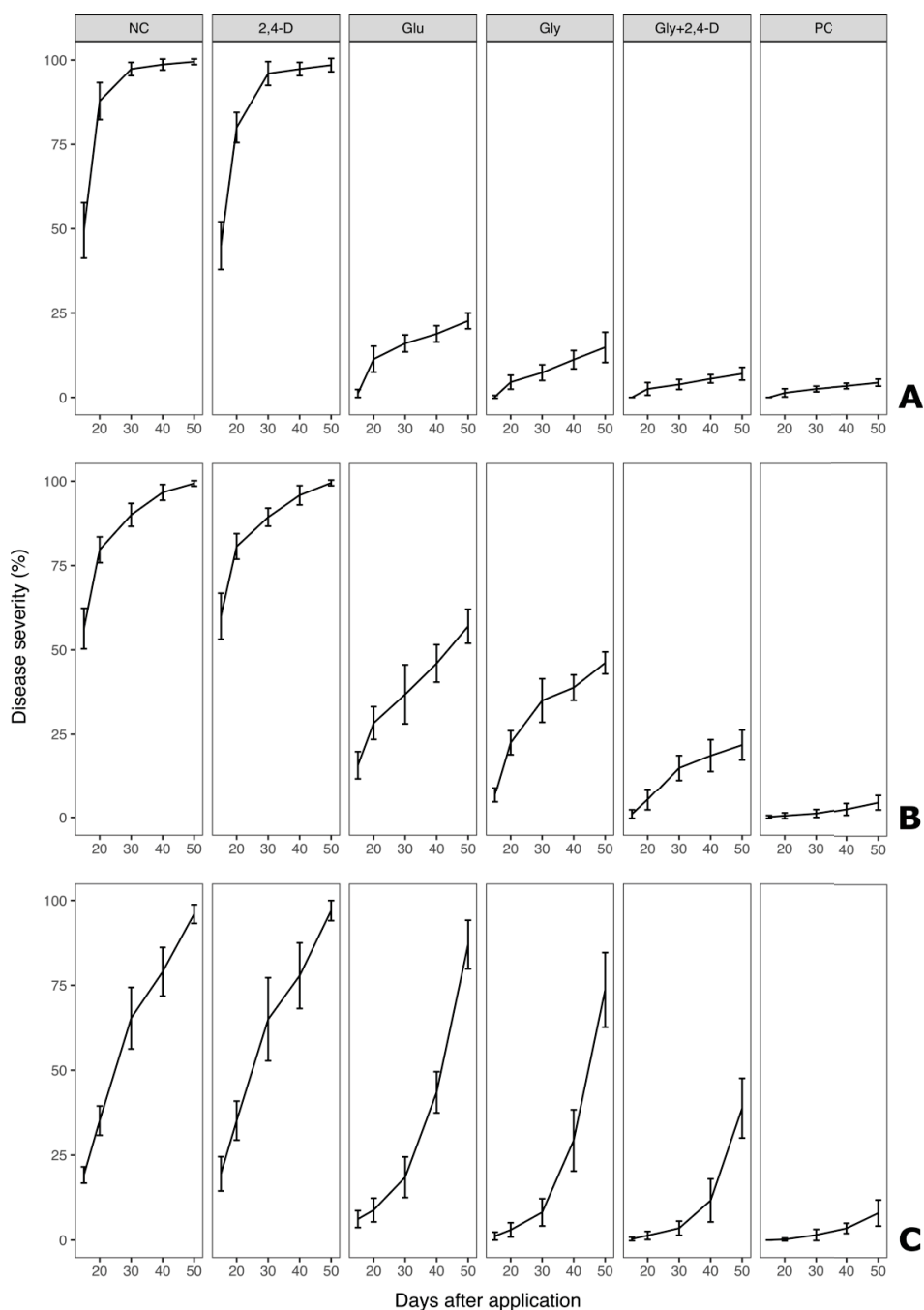


Figura S2. Curvas do progresso da severidade do oídio na soja cultivada em casa de vegetação em Curitiba/PR, 2020/2021. **A** - Ensaio 4, conduzido de agosto a outubro/2020; **B** – ensaio 5 (outubro a dezembro/2020); **C** - ensaio 6 (março a maio/2021). Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Glu (glufosinato de amônio, Finale®, BASF); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva); PC (controle positivo, trifloxistrobina + tebuconazol, Nativo®, Bayer).

IV CAPÍTULO 3 - HERBICIDAS REDUZEM A SEVERIDADE E ESPORULAÇÃO DE *Phakopsora pachyrhizi* EM SOJA COM TRIPLA TOLERÂNCIA A HERBICIDAS³

Título curto: Inibição da ferrugem asiática com herbicidas em soja tolerante

Autores: Alexandre Claus^{1,2}, Eduardo Roncatto², Arthur Arrobas Martins Barroso¹, Louise Larissa May De Mio^{2*}

¹Instituto Federal Catarinense, IFC. Rodovia SC 283 - km 17. CEP 89703-720, Concórdia, SC, Brasil. ²Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, UFPR, Universidade Federal do Paraná CEP 80035-050, Curitiba, PR, Brasil.

*Corresponding Author: E-mail: maydemio@ufpr.br

Palavras-chave: Transgênicos; Manejo químico; Sistema produtivo; 2,4-D; Glifosato; Enlist[®].

Resumo

Contexto: O evento transgênico DAS44406-6 (Enlist E3[®]) - E3 confere a soja tolerância a herbicidas e resistência a lagartas. A soja com esta tecnologia foi liberada recentemente em grande parte do mundo e no Brasil o seu cultivo comercial se iniciou na safra 2021/2022. Assim, esta pesquisa foi iniciada para elucidar se os herbicidas glifosato (Gly) e 2,4-D aplicados isolados e em mistura comercial apresentam efeitos na ferrugem asiática da soja – (FAS). Foram conduzidos ensaios *in vitro*, em folha destacada, e *in vivo*, em ambiente controlado, com inoculação artificial do patógeno associados a aplicação de herbicidas. Os herbicidas Gly, 2,4-D e Gly+2,4-D foram utilizados em meio de cultura para avaliar a germinação de esporos e aplicados via foliar antes e após a inoculação do fungo, avaliando-se a severidade da doença e a produção de esporos.

³Capítulo preparado com divisões de tópicos conforme normas da revista *Pest Management Science*.

Resultados: Todos os herbicidas inibiram a germinação de esporos. Entretanto, somente os herbicidas Gly e Gly+2,4-D apresentaram efeito de inibitório para FAS em folhas destacadas e *in vivo*. Quando aplicados de forma preventiva e curativa *in vivo*, reduziram a severidade da doença e a produção de esporos do fungo. *In vivo* a inibição da severidade chegou a 87% para Gly+2,4-D, e 42% para o Gly. Observa-se efeito sinérgico da mistura comercial Gly+2,4-D, devido a maior atividade de inibição da doença, se comparado com as aplicações dos ativos de forma isolada. A aplicação do 2,4-D isolada nos ensaios *in vivo* não reduziu ou aumentou a severidade. Os herbicidas Gly e Gly+2,4-D atuam de forma sistêmica e apresentam ação residual em plantas de soja na inibição da doença. O cultivo da soja com tecnologia E3 poderá aliar benefícios, não apenas para o manejo de plantas daninhas e lagartas, mas também na inibição da FAS com o uso de herbicidas.

Conclusão: A aplicação dos herbicidas Gly e Gly+2,4-D em soja tolerante E3 apresentam atividade inibitória para FAS.

1 INTRODUÇÃO

A soja - *Glycine max* é uma oleaginosa originária da China de grande importância mundial por suas várias utilizações em diferentes segmentos (Song et al. 2021). Insetos, plantas daninhas e doenças são as principais ameaças que limitam a produção da soja (Hartman et al. 2011). As plantas daninhas se destacam pelas interferências causadas na lavoura, que resultam em redução no rendimento de grãos e aumento dos custos de controle (Adegas et al. 2017). A sua interferência pode resultar em perdas de até 100%, caso não sejam utilizados métodos de controle eficientes (Chauhan, 2020). Este problema é aumentado com o alto número de plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil e no mundo (Gazziero et al. 2019; Chauhan, 2020; Barroso & Murata, 2021; Heap, 2021).

Pensando em minimizar o impacto do uso constante de um mesmo ingrediente ativo para o controle e manejo de plantas daninhas, incluindo populações resistentes a herbicidas na cultura da soja, foi desenvolvida a soja transgênica com a tecnologia DAS44406-6 (Enlist E3®) - E3 pela Corteva Agriscience (CIB, 2021; ISAAA, 2021). A soja E3 é o primeiro material liberado pela CTNBio de uma biotecnologia que

reúne em único evento transgênico a resistência a insetos com a tecnologia Bt e a tolerância tripla a herbicidas (CIB, 2021), permitindo assim o uso dos herbicidas glifosato (Gly), ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) e glufosinato de amônio (Glu) em pós-emergência dessa cultura (Green, 2018; Heap & Duke, 2018; Kniss, 2018).

Este material transgênico foi liberado recentemente em grande parte do mundo e no Brasil o seu cultivo comercial se iniciou na safra 2021/2022. Além da tecnologia da soja E3, foi também desenvolvida para uso em pós emergência da cultura, uma nova formulação de herbicidas em mistura (2,4-D colina+glifosato dimetilamina). A formulação colina de 2,4-D foi desenvolvida para reduzir o problema de deriva e volatilidade, em relação às formulações éster (Sosnoskie et al. 2015) e dimetilamina (Kalsing et al. 2018). Na soja E3, outras formulações de 2,4-D não estão autorizadas para uso em pós emergência (Peterson et al. 2016). Na soja E3, a aplicação destes herbicidas é recomendada desde a fase vegetativa até a reprodutiva R2 (plena floração) (Chahal et al. 2015). O estágio R1/R2 (Fehr et al. 1971) é o de maior susceptibilidade para ocorrência da ferrugem asiática da soja - FAS, causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, que é considerada a principal doença da cultura mundialmente (Yorinori & Lazzarotto, 2004; Savary et al. 2019).

É relatado que, na interação herbicida, patógenos e plantas, pode ocorrer aumento ou redução da severidade de doenças (Kortekamp, 2011; Sardrood & Goltapeh, 2018). Para o 2,4-D e glufosinato de amônio, como as culturas anteriormente não apresentavam tolerância a estes herbicidas, estudos que relacionam o seu uso com a ocorrência de doenças são escassos. No caso do glifosato, é descrito que seu uso apresenta atividade de controle para *P. pachyrhizi* (Feng et al. 2005; Feng et al. 2008) e *Erysiphe diffusa* (Silva, 2016) na soja tolerante com a tecnologia Roundup Ready® - (RR). Ressalta-se que a tolerância da soja RR possui algumas diferenças em relação a E3. A tolerância da RR é conferida pelo gene *cp4epsps* (Padgett et al. 1995), enquanto na soja E3 é devido ao gene *2mepsps* (Lepping et al. 2013). Quanto à recomendação de aplicação do glifosato em pós emergência da cultura da soja RR, esta deve ser realizada até o início do estágio reprodutivo (R1), enquanto na soja E3, até o estágio R2 (Rodrigues & Almeida, 2018).

Devido ao recente lançamento comercial da soja com tecnologia Enlist E3® (2021/2022) no Brasil, pouco se sabe sobre o uso desses herbicidas em doses recomendadas em bula para controle de plantas daninhas em pós emergência da cultura da soja tolerante em relação com a ocorrência de doenças, como a FAS. Os

objetivos deste estudo foram avaliar o efeito dos herbicidas Gly, 2,4-D e Gly+2,4-D, na germinação de esporos de *P. pachyrhizi* *in vitro*, e na severidade e produção de esporos em aplicação foliar na soja E3. Além disso, analisamos a ação preventiva e curativa dos tratamentos, a duração da atividade inibitória da doença e a sistemicidade em planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três tipos de ensaios principais. Ensaio *in vitro*, em que se avaliou a germinação de esporos de *P. pachyrhizi* em meio contendo os tratamentos; ensaio em folhas destacadas, avaliando a severidade da FAS em relação a tratamentos preventivos e curativos; ensaios *in vivo* com plantas em vasos, e a realização de tratamentos preventivos e curativos, avaliando a severidade da FAS e a massa da produção diária de esporos. Estes ensaios são detalhados na sequência. Esta disponível a Figura S1 e S2, que foram elaboradas para ilustrar e complementar a descrição dos ensaios realizados neste estudo.

2.1 Cultivares e herbicidas

Foram utilizadas a soja com a tecnologia Enlist E3[®], que possui tolerância ao 2,4-D e glifosato para os ensaios de atividade de inibição da FAS; e a cultivar BMX Potência RR[®], suscetível para multiplicação do inóculo de *P. pachyrhizi*.

Em vasos plásticos de 5 L preenchido com solo, foram semeadas cinco sementes de soja. Após 15 dias da emergência das plântulas, foram realizados desbastes e mantidas duas plantas por vaso. Os vasos receberam irrigação diretamente ao solo duas vezes por semana após a emergência. Foram realizadas duas adubações com o formulado NPK 5-20-20, aos 10 e 25 dias após emergência.

Os tratamentos foram os herbicidas comerciais nas doses: 581.69 g ea ha⁻¹ do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina (Enlist[®] Colex-D[®], 668.62 g L⁻¹, Dow AgroSciences) (2,4-D); 624 g ea ha⁻¹ de glifosato sal dimetilamina (Glizmax Prime[®], 480 g L⁻¹, Dow AgroSciences) (Gly); 615 g ea ha⁻¹ glifosato sal dimetilamina + 585 g ea ha⁻¹ ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina (EnlistDuo[®] Colex-D[®], 205 g ea L⁻¹ + 195 g ea ha⁻¹, Dow AgroSciences) (Gly+2,4-D).

2.2 Obtenção do inóculo e inoculações

Foram utilizados para os ensaios uma mistura de esporos de seis populações de *P. pachyrhizi*, oriundos de folhas de soja naturalmente infectadas de áreas de coletas distintas, que representam as principais regiões produtoras de soja do Brasil da safra 2017/2018. Estas populações possuem a presença das mutações que conferem resistência do patógeno aos fungicidas dos grupos químicos Qols, DMIs e SDHIs, que foram caracterizadas e descritas no trabalho de Claus et al. (2022).

O inóculo foi mantido em constantes repicagem em novas folhas destacadas da cultivar BMX Potência RR[®]. Para isso, folíolos de plantas cultivadas em casa de vegetação, em estágio V1 – V3, eram coletados com auxílio de tesoura, para a realização das inoculações. Suspensões de esporos eram obtidas por meio da raspagem de esporos de folíolos destacados e mantidos em placas de Petri em BOD a 20° C e fotoperíodo de 12 h. As raspagens dos folíolos foi realizada com auxílio de alça de Drigalski de poliestireno (10 µL) em Béquer (25 mL) contendo solução de água destilada + Tween20. Essa metodologia foi utilizada para todos os ensaios.

As inoculações foram realizadas com um aerógrafo (bico de 0,3 mm, alpha Arprex[®] 3) acoplado a um compressor de ar elétrico. As suspensões de esporos foram calibradas com auxílio de hemacitômetro na concentração de 10⁵ esporos/mL. Após a inoculação, os folíolos foram depositados em placas de Petri de poliestireno transparente de 90 mm de diâmetro, contendo 2% ágar/água e 30 mg L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. As placas foram incubadas a 22 °C na ausência de luz por 24 h e, posteriormente, a 20 °C com fotoperíodo de 12 h por cerca de 15 a 20 dias, quando as novas urédias esporulantes das folhas incubadas eram transferidas para novos folíolos, conforme metodologia acima, ou as folhas eram utilizadas para a quantificação da severidade da doença, nos ensaios em folha destacada.

As inoculações de todos ensaios foram realizadas em folíolos do terceiro trifólio de plantas de soja E3. Para os ensaios em folhas destacadas, a inoculação foi realizada na face abaxial dos folíolos, e a incubação conforme condições descritas anteriormente. Nos ensaios *in vivo*, as inoculações foram diretamente nos trifólios das plantas, realizado em ambas as faces foliares homogeneamente, e após inoculação estas foram incubadas em câmara de crescimento, conforme descrito no item 2.3.3.

2.3 Descrição dos ensaios

2.3.1 Ensaio *in vitro*

Os tratamentos com os herbicidas comerciais foram dosados e misturados por agitação em copos descartáveis de 100 mL, contendo solução de água destilada. Na sequência foram adicionados e misturados em erlemeyer de 50 mL, contendo meio 2% ágar/água fundente a aproximadamente 45 °C. O meio foi vertido em placas de Petri esterilizadas (49 x 12 mm), e mantidas até a solidificação em temperatura ambiente na ausência de luz direta.

Após obtenção de inóculo (item 2.2), 100 µL de suspensões de esporos a concentração de 10^5 esporos/mL foram adicionadas nas placas de Petri com auxílio de micropipeta na superfície do meio de cultura em cada placa e espalhadas com o auxílio de alças de Drigalski. As placas foram incubadas no escuro por 8 h na ausência de luz a 22 °C, em câmara de crescimento. Após esse período, 3 gotas de 0.05 mL de lactofenol foram adicionadas em cada placa para paralisar a germinação.

A germinação dos esporos foi avaliada em microscopia óptica na objetiva de 10x, com a contagem de 100 esporos por placa. Esporos com tubo germinativo pelo menos 1,5 vezes maior que os seus diâmetros foram considerados germinados (Blum et al. 2015).

2.3.2 Ensaio em folha destacada

Nestes ensaios foram realizados diferentes momentos de aplicação dos tratamentos, para avaliar atividade de inibição preventiva e curativa. Foram realizados três ensaios em folha destacada: (i) tratamentos preventivos e curativos, com 1 dia antes da inoculação - DBI e 1 dia após a inoculação - DAI, aplicados por meio da imersão dos folíolos nos tratamentos; (ii) tratamentos preventivos realizados com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 DBI, aplicados por meio de CO₂; (iii) tratamentos curativos realizados com 1, 2, 3, 5 e 10 DAI, aplicados por meio da imersão dos folíolos nos tratamentos. Em todos ensaios em folha destacada foram utilizadas a metodologia

adaptada para ensaios de EC₅₀ de fungicidas em folhas destacadas de soja de Scherb & Mehl (2006), e a avaliação da severidade foi realizada após 15 dias da inoculação.

2.3.2.1 Ensaios preventivos - 1 DBI e curativo - 1 DAI (folha destacada)

Nos ensaios com tratamentos preventivos e curativos realizados com 1 dia antes da inoculação - DBI e 1 dia após a inoculação - DAI, após coleta do 3º trifólio dos vasos, os folíolos foram tratados por meio da sua imersão em calda dos tratamentos por 3 s, colocados por aproximadamente 5 min em bancada sobre papel toalha antes de acondicionar em placas de Petri e incubar em BOD. Para a inoculação e incubação, utilizou-se a metodologia descrita no item 2.2.

2.3.2.2 Ensaios preventivos – DBI (folha destacada)

Os tratamentos foram aplicados por com pulverizador do tipo CO₂ em um único dia em plantas no estádio V4 (Fehr et al. 1971). Após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até completar os dias para serem inoculadas em cada momento: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 dias após a aplicação dos tratamentos. Ao completar o período de dias para receber a inoculação com suspensão de esporos de *P. pachyrhizi*, realizou-se a coleta do terceiro trifólio com auxílio de uma tesoura, e os folíolos individuais foram inoculados, adicionados em placa de Petri com 2% ágar-água, e incubados em BOD, conforme metodologia indicada no item 2.2.

2.3.2.3 Ensaios curativos – DAI (folha destacada)

Os tratamentos foram realizados por meio de imersão das folhas nas caldas dos tratamentos nos dias: 1, 2, 3, 5, 10 DAI. A imersão foi realizada de acordo com o item 2.3.2.1. Folíolos destacados foram inoculados no mesmo dia a partir da mesma suspensão de esporos, como descrito anteriormente. Ao chegar nos respectivos momentos da realização dos tratamentos, os folíolos foram retirados das placas de Petri e os tratamentos foram realizados. As folhas foram novamente incubadas até o momento de avaliação da severidade, que foi realizada após 15 dias da inoculação.

2.3.3 Ensaios preventivos - DBI (*in vivo*) e curativos – DAI (*in vivo*)

No primeiro ensaio *in vivo*, as plantas de soja E3 foram cultivadas em casa de vegetação até o dia em que foi aplicado os tratamentos, estágio V4 (Fehr et al. 1971). Na repetição deste, a fim de evitar contaminação espontânea por oídio, as plantas foram cultivadas desde a semeadura em câmara de crescimento (Convicon®), à 28 °C dia e 22 °C noite, umidade relativa de 90%, fotoperíodo de 12 h e intensidade de luz de 650 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com intuito de favorecer o desenvolvimento das plantas. Em casa de vegetação não havia controle de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo. Nesta a temperatura variou de 10 a 35 °C, umidade relativa de 50 a 85% e fotoperíodo de aproximadamente 12 h.

As aplicações dos tratamentos foram realizadas em dois diferentes dias com pulverizador do tipo CO₂. As plantas do ensaio DBI receberam primeiro a aplicação e, após 48 h nas plantas do ensaio DAI. Em ambos os ensaios, após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram acondicionadas em câmara de crescimento (Convicon®), cada tratamento em box separado para evitar a exposição por voláteis. Neste momento, foi programada a temperatura de 25 °C dia e 18 °C noite, fotoperíodo 12 h, umidade relativa de 90% e intensidade de luz de 650 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A inoculação das plantas dos ensaios (DBI e DAI) foi realizada 24 h após a primeira aplicação, ou seja, com uma única suspensão de esporos, com intuito de evitar qualquer variação na coleta dos dados devido diferenças no inóculo. Após a inoculação, todas as plantas foram incubadas em câmara de crescimento por 22 h na ausência de luz, 22 °C de temperatura e 100% de umidade relativa. Após 22 h de incubação, foi programado fotoperíodo de 12 h, umidade relativa de 90%, intensidade de luz de 650 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e mantido até o final experimento, com intuito de favorecer o desenvolvimento da doença. Ao completar 24 hrs das inoculações, as plantas do ensaio DAI foram retiradas das câmaras de crescimento, e efetuado a aplicação dos tratamentos com CO₂. Neste ensaio, foram avaliadas a severidade da doença e a massa total da produção de esporos (mg).

Para a massa total da produção de esporos, foi realizado a coleta diária de cada tratamento, de um total de 18 folíolos por tratamento. As coletas foram realizadas diariamente pelas manhãs, do 10° ao 34° dia após a inoculação no primeiro ensaio, e

do 10° ao 31° dia para o segundo ensaio. A coleta foi realizada em papel alumínio que era colocado abaixo dos trifólios inoculados, e por meio de impacto manual direto nos trifólios, promovendo a queda e deposição dos esporos em papel alumínio. Após a coleta, os esporos eram armazenados em microtubo 0,5 mL, e dessecados com sílica gel pelo período de 12 h, fechados e congelados a temperatura de - 20 °C. Após conclusão dos ensaios, a massa de esporos foi mensurada em balança analítica de precisão.

2.4 Aplicação dos tratamentos com equipamento de pulverização de CO₂

As plantas cultivadas em casa de vegetação e câmara de crescimento receberam a aplicação dos tratamentos em estádio V4 (Fehr et al. 1971). Os tratamentos foram aplicados com equipamento costal pressurizado com CO₂ com barra de 1 m de largura equipada com pontas AIXR110015 (TeeJet® Technologies - Spraying Systems, Wheaton, IL), calibradas para fornecer 200 L ha⁻¹ a 3kPa, trabalhando a uma altura de 50 cm do topo da planta, e uma velocidade de 1 m s⁻¹, atingindo uma faixa aplicada de 50 cm de largura por ponta de pulverização. As temperaturas no momento das aplicações variaram de 18 a 22 °C e umidade relativa do ar de aproximadamente 70%.

Os vasos com as plantas foram retirados da câmara de crescimento e casa de vegetação após 2 h na presença de luminosidade, a fim das folhas apresentarem nicnastia aberta para melhorar a cobertura das pulverizações. Os vasos foram colocados em linha para a pulverização. Cada tratamento foi aplicado separadamente no tempo e no espaço para evitar contaminação cruzada. Entre as aplicações, o equipamento de pulverização passou por lavagem com etanol 70%, seguido por um enxágue triplo com água para garantir a retirada de resíduos do produto anterior. Após cada aplicação, as plantas foram transferidas e acondicionados em box separados na câmara de crescimento e casa de vegetação, a fim de evitar problemas de contaminação por volatilização. Em câmara de crescimento a temperatura foi de 25 °C, umidade relativa de 90% e fotoperíodo de 12 h, com intensidade de 650 µE m s⁻¹. Em casa de vegetação não houve controle de temperatura, umidade e fotoperíodo, tendo estas variado de 10 a 35 °C, e de 50 a 85%, respectivamente, com fotoperíodo aproximado de 12 h.

2.5 Delineamento e análises estatísticas

Os ensaios *in vitro* e em folhas destacadas foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, realizados em duplicata. Nos ensaios em folha destacada, cada folíolo em uma placa de Petri foi considerado uma unidade experimental. Ensaios *in vivo* também foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento realizado em seis plantas, com todos os folíolos do terceiro trifólio de cada planta inoculados. A avaliação da severidade da doença foi realizada em 18 folíolos por tratamento. Nestes ensaios também foi realizada coleta diária da produção de esporos de 18 folíolos por tratamento, representando a massa total diária de cada tratamento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Nos ensaios em folhas destacadas e *in vivo*, após aproximadamente 15 dias da inoculação, a severidade da doença foi avaliada visualmente com auxílio de escala diagramática adaptada para níveis acima de severidade (Godoy et al. 2006). Foi considerado 0% para ausência de sintomas e 100% para toda área foliar com sintomas.

Para a análise estatística, os dados de germinação e severidade foram submetidos ao teste de Bartlett e ANOVA. Quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD) ao valor de probabilidade ($p \leq 0.05$), utilizando o pacote *ExpDes.pt* no *software* R (Ferreira et al. 2014). Os valores da massa diária da produção de esporos de cada ensaio foram utilizados para plotar curvas individuais dos valores da massa acumulada diária, por meio do *software* R.

3 RESULTADOS

A germinação de esporos foi totalmente inibida com a adição das doses recomendadas em bula dos herbicidas para o controle de plantas daninhas na soja E3, enquanto a germinação no tratamento NC (água) foi de 91% (dados não apresentados).

Nos ensaios preventivos e curativos com a imersão dos folíolos destacadas

nos tratamentos em 1 DBI e 1 DAI (Tabela 1), todos os tratamentos reduziram a severidade da FAS, diferindo ($p \leq 0.05$) do NC. Não houve interação dos tratamentos com herbicidas e o momento de aplicação (DBI e DAI). Em ambos os momentos de aplicação, o maior percentual de inibição foi para a mistura comercial Gly+2,4-D, com uma redução próxima de 100%, seguido do Gly com 96% e 2,4-D com 26%.

Para os ensaios preventivos em folha destacada com a aplicação dos tratamentos com equipamento de pulverização do tipo CO₂ e inoculação em nove momentos após a aplicação dos tratamentos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 15 DBI), o tratamento Gly+2,4-D foi o que apresentou a maior atividade inibitória ($p \leq 0.05$), seguido do Gly (Tabela 2). Para o Gly, houve redução na atividade de inibição no 15º dia após a realização do tratamento, não diferindo ($p > 0.05$) do 2,4-D e NC. O Gly+2,4-D apresentou atividade de inibição da doença por até 15 DBI.

Nos ensaios com tratamentos curativos realizados por meio de imersão dos folíolos (Tabela 3), em 5 momentos após a inoculação (1, 2, 3, 5 e 10 DAI), o tratamento Gly+2,4D foi o que apresentou maior eficiência na inibição da doença até cinco dias após a inoculação (Figura S3). No entanto, no 10º dia este tratamento causou necrose total dos folíolos, não sendo possível avaliar a severidade da doença. O Gly também apresentou atividade inibitória da doença ao longo dos 10 dias após a inoculação, sem causar necrose em nenhum dos momentos. O 2,4-D reduziu a severidade apenas no 5º dia após as inoculações. Houve interação entre tratamentos com herbicidas e os momentos de aplicação. Nos tratamentos Gly e 2,4-D, foi observada diferença ($p \leq 0.05$) que variou ao longo dos momentos. Para o Gly+2,4-D não ocorreram diferenças ($p > 0.05$) na inibição da doença para os diferentes momentos.

A severidade da doença reduziu com as aplicações de Gly+2,4-D e Gly para o ensaio *in vivo* (Tabela 4). Não houve interação dos tratamentos com herbicidas e o momento de aplicação (DBI e DAI). A Figura S4 apresenta as diferenças de severidade da doença por tratamento. Em ambos os momentos de aplicação, o maior percentual de inibição foi para o Gly+2,4-D, com uma redução de 87%, seguido do Gly com 41.65%. A aplicação de 2,4-D não reduziu a severidade da doença.

Os dados da massa diária da produção de esporos (Figura 1) foram analisados de forma acumulada por tratamento, pelo fato da massa de esporos produzida diariamente por planta ser baixa, impossibilitando obter-se dados com repetições. Assim, foi coletado a produção total de esporos de todas as plantas

diariamente por tratamento e momento de aplicação. Para o primeiro experimento com tratamento DAI, a curva acumulada dos esporos foi similar entre os tratamentos NC, 2,4-D e Gly. Em contraste, observou-se uma menor massa de esporos para as curvas acumuladas nos tratamentos Gly e Gly+2,4D, se comparado com o NC e 2,4-D nos demais experimentos. Comparando o primeiro com o segundo experimento, as curvas dos tratamentos se diferenciam, pois, no segundo experimento ocorreu menor produção de esporos, com as folhas vivas por mais tempo na planta.

4 DISCUSSÃO

Todos os herbicidas testados (Gly, 2,4-D e Gly+2,4-D) inibiram totalmente germinação de esporos, no entanto, em ensaios de folha destacada e *in vivo* os resultados para inibição da doença diferiram nestes tratamentos. Foi relatado que glifosato potássico inibe a germinação de esporos de *P. pachyrhizi* (Soares et al. 2008), corroborando para nosso estudo para o glifosato dimetilamina. O glifosato potássico também reduziu a germinação de aeciospóros da ferrugem - *Puccinia lagenophora*, agente de biocontrole de *Senecio vulgaris* (Wyss & Müller-Schärer, 2001). Para o 2,4-D, foi relatada a inibição de *Saccharomyces cerevisiae*, com redução no seu pH citosólico e vacuolar (Fernandes et al. 2003; Simões et al. 2003).

Em folhas detacadas e imersas nos tratamentos, todos os herbicidas apresentaram atividade inibitória da doença. No entanto, essa atividade foi reduzida se comparado ao efeito sobre o patógeno *in vitro*. Já quando os tratamentos foram realizados por meio de pulverização com CO₂, a atividade de inibição foi ainda menor. Acredita-se que os tratamentos realizados por meio de imersão das folhas, ocorre melhor distribuição e maior quantidade do produto em contato com os folíolos, além de não ocorrer translocação para outras partes da planta e assim a metabolização e/ou quebra da molécula é reduzida, proporcionando maior contato patógeno/tratamento/hospedeiro. Diferenças entre ensaios de laboratório *versus* ambiente controlado podem estar relacionadas a diferenças nas concentrações de inóculo e herbicidas, devido interação com fatores ambientais e solo, como já descrito em outros trabalhos (Anderson & Kolmer, 2005).

Em nosso estudo foi observado que a atividade de inibição da doença pelos herbicidas é transitória em aplicações preventivas, o que indica perda de eficiência inibitória ao longo dos dias. Em aplicações preventivas em condições de casa de

vegetação, o Gly apresentou atividade de inibição por até 10 DBI. No caso do Gly+2,4-D, foi por até 15 dias após a aplicação, período em que foi avaliado. Para o Gly, apesar do seu efeito ser transitório, a redução de infecções iniciais e o possível efeito fungistático já seria importante na redução de inóculo para uma provável epidemia. É descrito que em culturas RR, houve um declínio na eficiência de controle do Gly ao longo do tempo devido a um efeito transitório. Esse efeito transitório do Gly foi atribuído pela diminuição da sua concentração nas folhas, devido a diluição e quebra da molécula dos tecidos em crescimento da planta, chegando a um nível não inibitório (Anderson & Kolmer, 2005; Feng et al. 2008; Samac & Foster-Hartnett, 2012). Isso também pode acontecer para a mistura comercial Gly+2,4-D. Para a FAS em trabalho previamente conduzido, o glifosato apresentou atividade de controle por até 14 DAA (Feng et al. 2005); para ferrugem do trigo entre 21 – 35 DAA (Anderson & Kolmer, 2005); para ferrugem da alfafa, quando aplicado na dose recomendada, foi eficaz por até 10 DAA (Samac & Foster-Hartnett, 2012). Todos esses resultados são de ambiente controlado e com transgenia diferente da que utilizamos.

O tratamento com 2,4-D, na maioria dos casos, foi ineficiente para reduzir a doença, seja em ensaios em folha destacada e em ensaios *in vivo*, com aplicações com CO₂. Como anteriormente não havia culturas tolerantes ao 2,4-D, a literatura é escassa no que diz respeito a interação 2,4-D, planta e patógeno. No entanto, similar ao observado em nosso ensaio de germinação, o 2,4-D também inibiu o crescimento *in vitro* de outros fungos fitopatogênicos (Pakdaman et al. 2002; Tripathi et al. 1988). Quando aplicado em gramíneas sem o gene de tolerância, o 2,4-D causou maior suscetibilidade das plantas de milho a *Bipolaris maydis* (Oka & Pimentel, 1976) e de trigo a *B. sorokiniana* (Hsia & Christensen, 1951). Neste último caso, o aumento da doença foi relacionado a plantas enfraquecidas e atrofiadas (Hsia & Christensen, 1951). Plantas enfraquecidas são benéficas a patógenos necrotróficos, mas não para biotróficos, como é o caso da *P. pachyrhizi*.

O efeito potencializado da mistura comercial Gly+2,4-D é um resultado intrigante, que indica sinergismo. Infelizmente, existem poucos relatos sobre efeitos sinérgicos, antagônicos da associação de herbicidas e relação com organismos não alvos, embora esses efeitos sejam esperados (Kortekamp, 2011). Como herbicidas geralmente são utilizados em associação, a fim de atingir várias espécies de plantas daninhas com uma única aplicação (Rose, 2016), estudos com essa abordagem se tornam interessantes. O efeito sinérgico dessa mistura comercial, pode ser devido a

uma atuação em conjunto dessas moléculas, desempenhando papel na defesa vegetal contra patógenos biotróficos, devido ao estímulo na produção de etileno que ambos os herbicidas possuem (Raghavan et al. 2006; Guerreiro et al. 2016; Einhardt et al. 2020).

O 2,4-D em plantas sensíveis atua na sinalização e produção de etileno e ácido abscísico, e ambos se relacionam com a defesa vegetal. O ácido abscísico induz o fechamento dos estômatos, e na presença de luz causa superprodução e acúmulo de espécies reativas de oxigênio/peróxido de hidrogênio, resultando em danos oxidativos em (Cobb e Reade, 2010; Christoffoleti et al. 2015). Altos níveis de peróxido de hidrogênio são tóxicos para fungos (Heller & Tudzynski, 2011). Doses de 2,4-D acima da utilizada neste estudo, poderia apresentar atividade de inibição, como foi observado no ensaio com tratamento realizado por meio da imersão das folhas e na germinação de esporos *in vitro*. Para o Gly, é relatado que sua atividade de inibição para doenças pode ocorrer de forma indireta e indireta. Aplicações de Gly em soja se relacionam ao acúmulo de gliceolina, que é uma fitoalexina tóxica a patógenos (Holliday & Keen, 1982; Keen et al. 1982). Causam inibição da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (*EPSPs*) presente em fungos (Kruse, Trezzi & Vidal, 2000; Feng et al. 2005), afetando a rota metabólica do ácido chiquímico, que se relaciona com a produção de ácido salicílico que sinaliza a defesa da planta (Altman & Campbell, 1977; Hammond-Kosack & Jones, 2000; Arcuri et al. 2004).

Outra informação que possa explicar o efeito sinérgico é o fato de que quando utilizados em mistura, o 2,4-D causa redução na taxa de absorção do Gly e a sua translocação em plantas (Figueiredo et al. 2017; Li et al. 2020). A absorção reduz em até 20% e a translocação em até 12%, se comparado com a aplicação do Gly isolada. O efeito sinérgico na redução da FAS que observamos em nosso estudo pode ser devido a uma maior concentração do Gly presente nas folhas que receberam a aplicação. Com isso, além de maior concentração de produto presente, a formação e acúmulo de metabólitos que são deletérios a planta e ao fungo podem estar em maior concentração. Isso pode ser reforçado devido aos pontos de necrose no limbo foliar que esse tratamento causou.

Para Gly, em aplicações isoladas, foi descrito atividade preventiva e curativa para *Phakopsora pachyrhizi* na cultura da soja RR, de forma dependente da concentração sistêmica do Gly presente na planta (Feng et al. 2005; Feng et al. 2007). Foi sugerido a ação direta do herbicida Gly ao inibir o gene *EPSPs* do fungo, pelo

mesmo mecanismo de ação herbicida (Feng et al. 2005). É relatado ainda o efeito indireto, pois o Gly aplicado em plantas com biótipos resistentes e sensíveis ao glifosato levam ao acúmulo de ácido chiquímico e peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e enzima ascorbato peroxidase (APX), levando ao estresse oxidativo em plantas por meio da superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cobb & Reade, 2010; Maroli et al. 2015). Em biótipos resistente ao glifosato, o estresse oxidativo e o dano tecidual são menores, e as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX são maiores se comparado com biótipo sensível (Piasecki et al. 2018). As ROS podem servir como moléculas de sinalização em resposta a estresses (Das & Roychoudhury, 2014). Os acúmulos dessas substâncias se relacionam a menor ocorrência de doenças (Heller & Tudzynski, 2011; Amiri et al. 2020).

Em aplicações curativas, assim como também ocorreu nos ensaios preventivos, o Gly+2,4D foi o que apresentou maior eficiência na inibição da doença até cinco dias após a inoculação, seguido do Gly, que inibiu em todos os momentos estudados (10 DAI). Para a ferrugem da alfafa, foi demonstrado controle total da doença quando o Gly foi aplicado de forma curativa, após 10 dias da inoculação do fungo (Samac & Foster-Hartnett, 2012). O 2,4-D apresentou atividade de inibição apenas no 5° DAI, assim pode ser que ele atue na inibição da esporulação, e este seja um momento chave para a FAS, que inicia sua esporulação visível entre 7 a 10 dias. Cabe destacar que no 10° DAI, o Gly+2,4-D causou necrose total dos folíolos, não sendo possível avaliar a severidade da doença. O Gly+2,4-D também causou leve queima dos bordos e pontos de necrose em alguns folíolos nos ensaios em folha destacadas e *in vivo*. Caso aplicações de campo com Gly+2,4-D em soja com a presença do patógeno também causem necrose, novos estudos devem ser realizados.

Nosso estudo demonstra o efeito indireto ou sistêmico do Gly e Gly+2,4-D na inibição do patógeno. Nos ensaios com aplicação dos tratamentos via CO₂, os herbicidas atingem apenas a superfície adaxial das folhas. Na sequência as folhas são destacadas e a inoculação é feita apenas face abaxial das folhas. Como foi observado atividade de inibição da doença, pode se concluir que ocorre efeito indireto destes herbicidas, atuando na redução severidade da FAS que foi inoculada na superfície da folha que não recebeu a aplicação do herbicida diretamente, por um efeito sistêmico ou translaminar. É descrito que o glifosato é absorvido e transloca sistemicamente pelo tecido das plantas (Feng et al. 2005). O Gly pode atuar com um

fungicida sistêmico e também induzir uma resistência sistêmica, pois folhas não tratadas foram protegidas após a aplicação do herbicida (Kortekamp, 2011).

Nos ensaios *in vivo*, a produção de esporos foi reduzida pelos tratamentos com Gly e Gly+2,4-D. Isso demonstra a eficiência destes tratamentos na redução da severidade e, conseqüentemente na massa de esporos. A *P. pachyrhizi* possui esporos leves, e a disseminação a longas distâncias é considerada de grande importância na ocorrência dessa doença. Como se trata de uma doença policíclica, que inicia a produção de esporos após cerca de 7 a 9 dias da infecção inicial, a redução do inóculo secundário poderá aumentar o tempo em dias para ocorrência de uma epidemia. Além disso, produzir menor quantidade de esporos, pode ser muito importante para a redução da seleção de cepas resistentes a fungicidas. Diante das inconsistências do resultado plotado para a massa acumulada de esporos e se comparado com os dados de severidade, cabe destacar que durante a realização da primeira repetição deste ensaio, ocorreu a queda de folhas inoculadas, sendo associado a elevada severidade da doença. Em plantas dos tratamentos que ocorreram queda de folhas, mesmo com alto valor de severidade, com a falta de folhas, a produção de esporos foi reduzida.

Pelo fato do Gly e Gly+2,4-D apresentarem atividade de inibição nos ensaios *in vivo* (DBI e DAI), que são condições mais próximas da realidade de campo, possivelmente estes produtos podem vir atuar em complemento com fungicidas no manejo da FAS, sendo necessário mais estudos a níveis de campo e laboratoriais para avaliar o impacto real. Cabe ressaltar que novos produtos são cada vez mais importantes para controle de FAS no Brasil, pois as moléculas de fungicidas disponíveis (DMIs, Qols e SDHIs) apresentam redução de eficiência de controle devido a presença de mutações no fungo (Schmitz et al. 2013; Klosowski et al. 2015; Simões et al. 2017, Müller et al. 2021). Aplicações de herbicidas em soja E3, além de controlar plantas daninhas durante o ciclo da cultura, com base em nossos resultados poderão minimizar o impacto da FAS. A aplicação inteligente dos herbicidas Gly e Gly+2,4-D, poderá reduzir o risco de epidemias de FAS, pela diminuição do inóculo primário e secundário de *P. pachyrhizi*, assim como minimizar o risco de resistência deste patógeno e de plantas daninhas resistentes. Além disso, destaca-se que a soja E3 apresenta tolerância ao Gly e 2,4-D, e também ao glufosinato de amônio. Em outro estudo que conduzimos, esse último herbicida reduziu a severidade do oídio da soja. Isso também foi observado em ensaios preliminares para esse herbicida em relação

a FAS, que será objetivo de novas investigações.

A metodologia da folha destacada que utilizamos, parece ser uma ótima ferramenta para se utilizar na investigação da ação de herbicidas aplicado via CO₂ em plantas em relação a doenças. Pelo nosso conhecimento, essa metodologia nunca foi utilizada em outros estudos com essa finalidade. Poderá servir para investigar a ação de moléculas sobre doenças em culturas tolerantes de forma otimizada, utilizando herbicidas isolados, em associações e até mesmo associando herbicidas a fungicidas e/ou produtos para biocontrole. Além disso, para área da matologia, essa metodologia possa ser interessante para ensaios de *screening* para identificar biótipos de plantas daninhas resistentes de forma mais rápida, para investigar seletividade e também a tolerância de culturas OGMs.

Como há poucas cultivares comercialmente disponíveis com resistência genética à FAS e número limitado de fungicidas com boa eficiência de controle devido a mutações do fungo que conferem resistência, a possibilidade de manejo com o uso desses herbicidas fornece uma ferramenta adicional. Estudos multidisciplinares sobre o impacto do uso desses e de outros herbicidas na soja e, em outras culturas tolerantes que compõem o sistema produtivo são importantes para se obter maior clareza na relação: herbicida x patógeno x hospedeiro x ambiente, pensando no manejo integrado, tanto de doenças, como de plantas daninhas.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001. O primeiro autor agradece ao Instituto Federal Catarinense (IFC) Concórdia/SC – Brasil pelo afastamento integral para realização do doutorado. O terceiro e quarto autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Brasil pela bolsa de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Adegas, F. S., Vargas, L., Gazziero, D. L. P., Karam, D. 2017. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Londrina: Embrapa, 12p. (Circular Técnica; n. 132).
- Amiri, A., Zuniga, A., Peres, N. 2020. Mutations in the membrane-anchored sdhc subunit affect fitness and sensitivity to succinate dehydrogenase inhibitors in *Botrytis cinerea* populations from multiple hosts. *Phytopathol.* 10.1094/phyto-07-19-0240-r.
- Anderson, J. A., and Kolmer, J. A. 2005. Rust control in glyphosate tolerant wheat following application of the herbicide glyphosate. *Plant Dis.* 89:1136-1142.
- Barroso, A. A. M., Murata, A. T. (org.). **Matologia**: estudos sobre plantas daninhas. Curitiba: UFPR, 2021. 547 p. ISBN 978-65-00-16757-3.
- Blum, M. M. C., Reis, E.M., Franciei, T. V., Carlini, R. 2015. *In vitro* effect of substrate, temperature and photoperiod on *Phakopsora pachyrhizi* urediniospore germination and germ tube growth. *Summa Phytopathol.* 41(2):101-106. doi.org/10.1590/0100-5405/1999.
- Chahal, P. S., Aulakh, J. S., Rosenbaum, K., Jhala, A. J. 2015. Growth stage affects dose response of selected glyphosate- resistant weeds to premix of 2,4-D choline and glyphosate (Enlist Duo™ Herbicide). *J Agric Sci.* 7(11):1-10.
- Chauhan, B. S. 2020. Grand Challenges in Weed Management. *Front. Agron.* 1:3. doi: 10.3389/fagro.2019.00003.
- Claus, A., Simões, K., Mio, May De Mio, L. L. 2022. *SdhC*-I86F mutation in *Phakopsora pachyrhizi* is stable and can be related to fitness penalties. *Phytopathology*. First Look, 26 jan. 2022 (*in press*). <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-10-21-0419-r>.
- Christoffoleti, P. J., Figueiredo, M. R. A., Peres, L. E. P., Scott N., Gaines T. 2015. Auxinic herbicides, mechanisms of action, and weed resistance: A look into recent plant science advances. *Sci. Agric.*, v. 72, n. 4, p. 356-362.

- CIB - CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. Produtos Aprovados. Online. 2021. Disponível em:< <https://cib.org.br/produtos-aprovados/>>. Acesso em: 10 dez. 2021.
- Cobb, A. H., Reade, J. P. H. **Herbicides and Plant Physiology**, 2nd ed.; Wiley-Blackwell: Shropshire, UK, 2010; p. 286.
- Das, K., Roychoudhury, A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Plant Sci.* 2, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., Pennington, J. S. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.*, 11, 929e931.
- Feng, P. C. C., Baley, G. J., Clinton, W. P., Bunkers, G. J., Alibhai, M. F., Paulitz, T. C., Kidwell, K. K. 2005. Glyphosate inhibits rust disease sin glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 48, 17290e17295.
- Feng, P. C. C., Clark, C., Andrade, G. C., Balbi, M. C., Caldwell, P. 2007. The control of Asian rust by glyphosate in glyphosate-resistant soybeans. *Pest Manag Sci.*, 64:353-359.
- Fernandes, A. R., P. J., Durão, P. M., Santos, I., Sá-Correia. 2003. Activation and significance of vacuolar H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* adaptation and resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 312, 1317- 24.
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P. and Nogueira, D. A. 2014. *ExpDes*: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Appl. Math.* 5, 2952-2958. [dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280](https://doi.org/10.4236/am.2014.519280).
- Gazziero, D. L. P., Adegas, F. S., Silva, A. F., Concenço, G. 2019. Estimating yield losses in soybean due to sourgrass interference. *Planta Daninha*, v. 37. doi.org/10.1590/s0100-83582019370100047.
- Godoy, C. V., Koga, L. J., Canteri, M. G. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatol. Bras.* 31:63–68.
- Green, J. M. 2018. The rise and future of glyphosate-resistant crops. *Pest Manag Sci.*

- 74(5), 1035-1039. doi:10.1002/os/4462.
- Hartman, G. L., West, E. D., Herman, T. K. 2021. Crops that feed the World 2. Soybean worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Sec.* **3**, 5–17. doi.org/10.1007/s12571-010-0108-x.
- Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. Monday, October 18, Available www.weedscience.org (2021).
- Heap, L., Duke, S. O. 2018. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag Sci.* 74(5), 1040-1049. Doi:10.1002/os.4760.
- Heller, J., Tudzynski, P., 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 369–390. doi 10.1146/annurev-phyto-072910-095355.
- Hsia, Y. T., Christensen, J. J. 1951. Effect of 2,4-D on seedling blight of wheat caused by *Helminthosporium sativum*. *Phytopathol.* 41:1011–1020.
- ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2021). GM Crop Events approved in Brazil. Disponível em: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>. Acesso em: 18 nov. 2021.
- Kalsing, A., Lucio, F. R., Rossi, C. V. S., Rampazzo, P. E., Gonçalves, F. P., Valeriano, R. 2018. Tolerance of DAS-444Ø6-6 and DAS- 444Ø6-6 x DAS-81419-2 soybeans to 2,4-D and glyphosate in the Cerrado region of Brazil. *Planta Daninha* 36:e018174410.
- Klosowski, A. C., May De Mio, L. L., Miessner, S., Rodrigues, R., Stammer, G. 2015. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Manag. Sci.* v. 72, p. 1211-1215.
- Kniss, A. R. 2018. Soybean response to dicamba: a meta-analysis. *Weed Technology* **32**: 507-512.
- Kortekamp, A. 2011. Herbicides and environment. InTech, Rijeka, Croatia. <https://library.umac.mo/ebooks/b28109740.pdf>.

- Lepping, M. D., Herman, R. A., Potts, B. L. 2013. Compositional equivalence of DAS-44406-6 (AAD-12 + 2mEPSPS + PAT) herbicide-tolerant soybean and nontransgenic soybean. *J Agric Food Chem.* 61(46):11180-11190.
- Li, J., Han, H., Bai, L., Yu, Q. 2020. 2,4-D antagonizes glyphosate in glyphosate-resistant barnyard grass *Echinochloa colona*. *J Pestic Sci.* doi: 10.1584/jpestics.D20-013.
- Maroli, A. S., Nandula, V., Dayan, F. E., Duke, E., Gerard, P. and Tharayil, N. 2015. Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 9199-9209. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04223>.
- Müller, M. A., Stämmler, G., May De Mio, L. L. 2021. Multiple resistance to DMI, QoI and SDHI fungicides in field isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Crop Protection*. ISSN 0261-2194. doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105618.
- Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Dellannay, X., Re, D. B., Lavalley, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I.; Barry, G. F., Eichholtz, D. A., Peschke, V. M., Nida, D. L., Taylor, N. B., Kishore, G. M. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science*, v.35, p.1451-1461.
- Pakdaman, B. S., Khabbaz, H., Goltapeh, E. M., Afshari, H. A. 2002. In vitro studies on the effects of sugar beet fields prevalent herbicides on the beneficial and deleterious fungal species. *Pakistan J. Phytopathol.* 1, 23-24, ISSN 1812-5425.
- Peterson, M. A., McMaster, S. A., Riechers, D. E., Skelton, J., Stahlman, P. W. 2016. 2,4-D past, present, and future: a review. *Weed Technol.* 30(2):303-345.
- Piasecki, C., Carvalho, I. R., Cechin, J., Goulart, F. A. P., Maia, L. C., Agostinetto, D., Caverzan, A., Stewart Jr, C. N., Vargas, L. 2018. Oxidative stress and differential antioxidant enzyme activity in glyphosate-resistant and -sensitive hairy fleabane in response to glyphosate treatment. *Bragantia*. doi.org/10.1590/1678-4499.20180289.
- Raghavan C., Ong E., Dalling M., Stevenson T. 2006. Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Funct Integr Genomic.* 6, 60–70.

- Rodrigues, B. N., Almeida, F. S. 2018. Guia de herbicidas, 7th ed. Londrina, Ed. Authors.
- Rose, M. T., Cavagnaro, T. R., Scanlan, C. A., Rose, T. J., Vancov, T., Kimber, S., Kennedy, I. R., Kookana, R. S., Zwieten, L. V. 2016. Impact of herbicides on soil biology and function. *Adv Agron.* 136:133– 220. doi.org/10.1016/bs.agron.2015.11.005.
- Samac, D. A., Foster-Hartnett, D. 2012. Effect of glyphosate application on foliar diseases in glyphosate-tolerant alfalfa. *Plant Dis.* 96:1104–1110.
- Sardrood, P. B., Goltapeh, M. E. 2018. Weeds, Herbicides and Plant Disease Management. In: Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 31. *Sustain. Agric. Res.* vol 31. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-319-94232-23.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., Mc Roberts, N., Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol.* 3(3):430-439. doi: 10.1038/s41559-018-0793-y.
- Scherb, C. T., Mehl, A. 2006. Detached leaf monitoring method. Comitê de ação a resistência a fungicidas (FRAC). Available at: <http://www.frac.info/monitoring-methods>.
- Schmitz, H. K., Medeiros, C. Craig, I. R., Stammer, G. 2013. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards Qo inhibitors and demethylation inhibitors, and corresponding resistance. *Pest Manag Sci.* n. 70, p. 378-388.
- Silva, A. A. P. 2016. Associação de glyphosate e outros herbicidas com ácido salicílico na ocorrência de oídio, na rota do ácido chiquimico e comportamento na soja RR®. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro - Pr, Guarapuava.
- Simões, K., Hawlik, A., Rehfus, A., Gava, F., Stammer, G. 2017. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *J. Plant Dis. Protect.* v. 125, p. 21-26.
- Simões, T., Teixeira, M. C., Fernandes, A. R. Sá-Correia, I. 2003. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid,

mediated by Msn2p- and Msn4p-regulated genes: Important role of SPI1, *Appl. Environ.* Vol. 69(No. 7):4019-4028.

- Soares, R. M., Gazziero, D. L. P., Morita, D. A. S., Ciliato, M. L., Flausino, A. M., Santos, L. C. M., Janegitz, T. 2008. Utilização de glifosato para o controle de ferrugem da soja. *Pesqui. Agropecu. Bras.* Brasília, v.43, n.4, p.473-477.
- Sosnoskie, L. M., Culpepper, A. S., Braxton, L. B., Richburg, J. S. 2015. Evaluating the volatility of three formulations of 2,4-D when applied in the field. *Weed Technol.* 29: 177-184.
- Tripathi, S. K., Sathie, K. B., Vyas, S. C. 1988. Chemical control of collar rot of pea. *Indian Phytopathol.* 41:143–144.
- Wyss, G. S., Müller-Schärer, H. 2001. Effects of selected herbicides on the germination and infection process of *Puccinia lagenophora*, a biocontrol pathogen of *Senecio vulgaris*. *Biol. Control.* 20:160–166.
- Yorinori, J. T., Junior, J. N., Lazzarotto, J. J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância, economia e controle. Embrapa. Documentos 247, 36p, 2004.

Tabela 1. Médias da severidade da ferrugem asiática da soja após tratamentos preventivos aplicados antes da inoculação, e curativos aplicados após a inoculação, com a imersão total de folíolos destacados em calda com tratamento e incubadas conforme metodologia de folha destacada.

Tratamentos antes e após as inoculações ^x	Severidade (%) da ferrugem asiática da soja após 15 dias de incubação	
	DBI ^y	DAI ^y
NC	81.69±10.75 aA	78.81±9.35 aA
2,4-D	60.00±13.78 bA	58.75±11.47 bA
Gly	0.03±0.09 cA	6.29±7.95 cA
Gly+2,4-D	0.00±0.00 cA	0.61±0.93 cA

^xTratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva).

^yTratamentos preventivos: 1 dia antes da inoculação – DBI. Tratamentos curativos: 1 dia após a inoculação – DAI. Letras minúsculas na coluna e maiúsculas iguais na linha não diferiram estatisticamente pelo teste Tukey HSD ($p>0.05$).

Tabela 2. Médias da severidade da ferrugem asiática da soja após tratamentos preventivos realizados antes da inoculação, aplicados com equipamento do tipo CO₂ e incubadas conforme metodologia de folha destacada.

Tratamentos antes das inoculações ^x	Severidade (%) da ferrugem asiática da soja após 15 dias de incubação em 9 momentos de inoculação ^y								
	1	2	3	4	5	6	7	10 ^z	15 ^z
NC	87.25±4.39 a	76.88±9.67 a	70.50±19.78 a	74.63±6.07 a	91.87±4.32 a	68.38±8.09 a	75.63±7.28 a	85.00±4.08 a	75.75±4.35 a
2,4-D	84.17±3.61 a	75.62±8.70 a	66.13±20.85 a	69.50±5.81 a	79.00±14.30 a	56.25±8.34 a	75.25±8.22 a	76.25±4.79 a	62.50±8.66 a
Gly	47.83±28.24 b	28.12±23.47 b	13.25±9.91 b	15.03±17.50 b	39.00±38.59 b	28.75±19.11 b	43.75±20.65 b	47.50±6.45 b	56.25±2.50 ab
Gly+2,4-D	7.13±6.73 c	4.18±4.52 c	1.91±2.26 b	5.04±6.04 b	9.75±5.70 c	5.79±6.51 c	16.00±5.29 c	22.50±8.66 c	35.75±4.34 b

^xTratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva).

^yTratamentos preventivos realizados em diferentes momentos: dias antes da inoculação - DBI: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 15 dias.

^zMomento sem repetição.

Letras minúsculas iguais na coluna não diferiram estatisticamente pelo teste Tukey HSD ($p>0.05$).

Tabela 3. Médias da severidade da ferrugem asiática da soja após tratamentos curativos realizados após a inoculação, aplicados com a imersão total de folíolos destacados em calda com tratamento e incubadas conforme metodologia de folha destacada.

Tratamentos após as inoculações ^x	Severidade (%) da ferrugem asiática da soja após 15 dias de incubação em 5 momentos de realização dos tratamentos ^y				
	1	2	3	5	10
NC	72.5±5.98 aC	77.87±4.79 aBC	88.88±6.17 aA	79.50±16.76 aABC	84.88±6.24 aAB
2,4-D	66.88±3.60 aB	70.75±2.96 aB	88.00±6.41 aA	65.00±8.45 bB	88.63±7.07 aA
Gly	29.75±5.52 bB	37.63±9.21 bAB	34.75±14.46 bB	35.00±7.56 cB	46.50±7.61 bA
Gly+2,4-D	4.71±3.14 cA	7.50±3.25 cA	6.00±4.93 cA	7.38±4.34 dA	na ^z

^xTratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva).

^yTratamentos curativos realizados em diferentes momentos: dias após da inoculação - DAI: 1, 2, 3, 4, 5 e 10 dias.

^zFolhas deste momento necrosaram.

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas iguais na linha não diferiram estatisticamente pelo teste Tukey HSD ($p>0.05$).

Tabela 4. Médias da severidade da ferrugem asiática da soja após tratamentos preventivos realizados antes da inoculação e curativos realizados após a inoculação, aplicados com equipamento do tipo CO₂ em plantas cultivadas em vaso, que foram mantidas *in vivo* em câmaras de crescimento até a avaliação da severidade.

Tratamentos antes e após as inoculações ^x	Severidade (%) da ferrugem asiática da soja após 15 dias de incubação	
	DBI ^y	DAI ^y
NC	46.75±21.54 aA	51.64±20.50 aA
2,4-D	42.28±22.53 aA	47.28±22.69 aA
Gly	28.30±22.83 bA	29.25±21.64 bA
Gly+2,4-D	0.86±1.12 cA	5.42±5.20 cA

^xTratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva).

^yTratamentos preventivos: 1 dia antes da inoculação – DBI. Tratamentos curativos: 1 dia após a inoculação – DAI. Letras minúsculas na coluna e maiúsculas iguais na linha não diferiram estatisticamente pelo teste Tukey HSD ($p>0.05$).

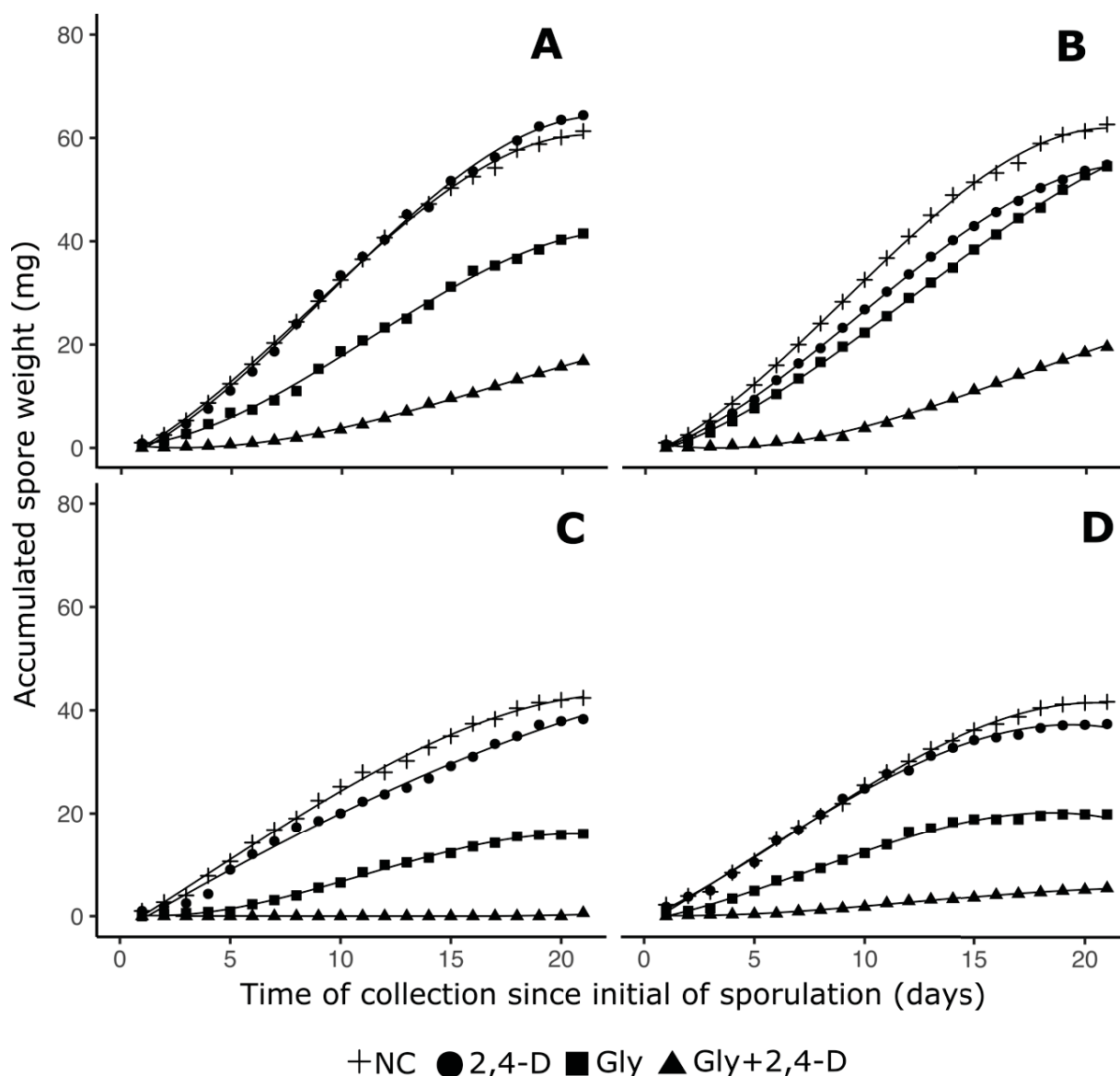
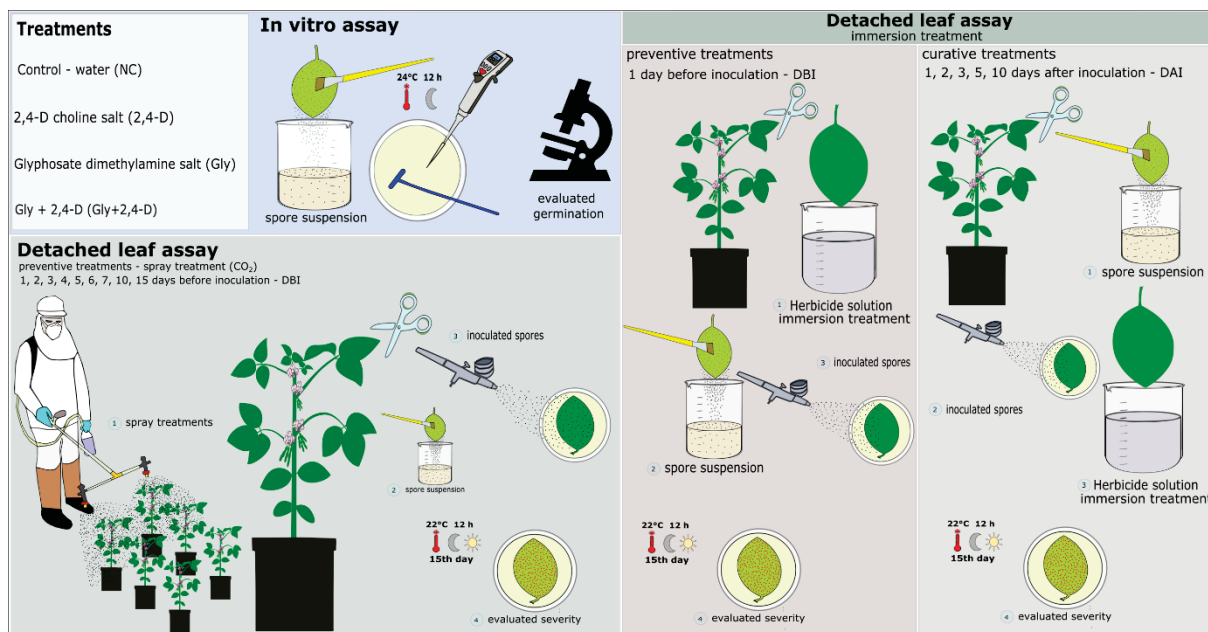


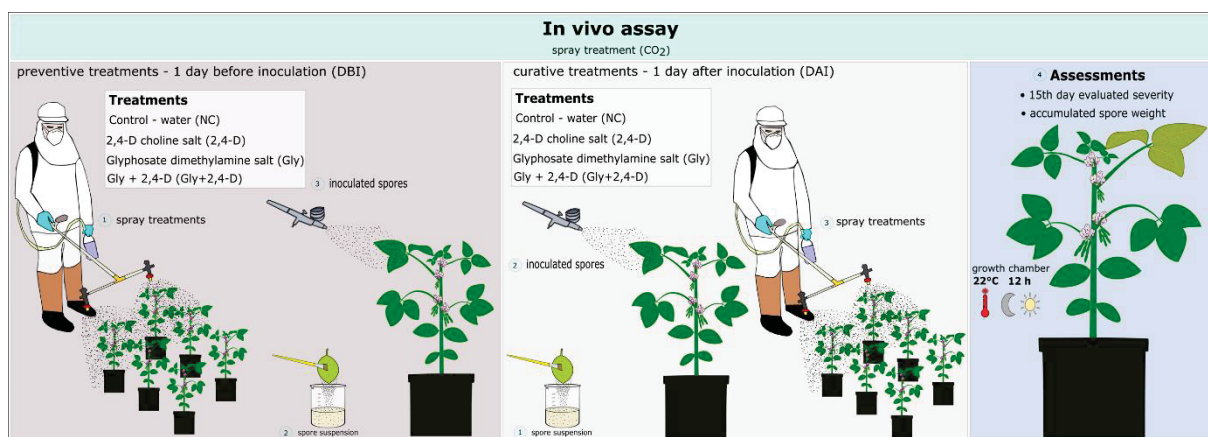
Figura 1. Curvas acumulada da produção de esporos de *P. pachyrhizi* por tratamento ao longo dos dias de coleta de folíolos do terceiro trifólio de plantas de soja cultivadas em vaso em câmara de crescimento. **A** – Tratamentos preventivos realizados 1 dia antes da inoculação - experimento 1; **B** - Tratamentos curativos realizados 1 dia após a inoculação - experimento 1; **C** - Tratamentos preventivos realizados 1 dia antes da inoculação - experimento 2; **D** - Tratamentos curativos realizados 1 dia após a inoculação - experimento 2. Tratamentos: NC (controle negativo - água); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva); Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva).

Material Suplementar



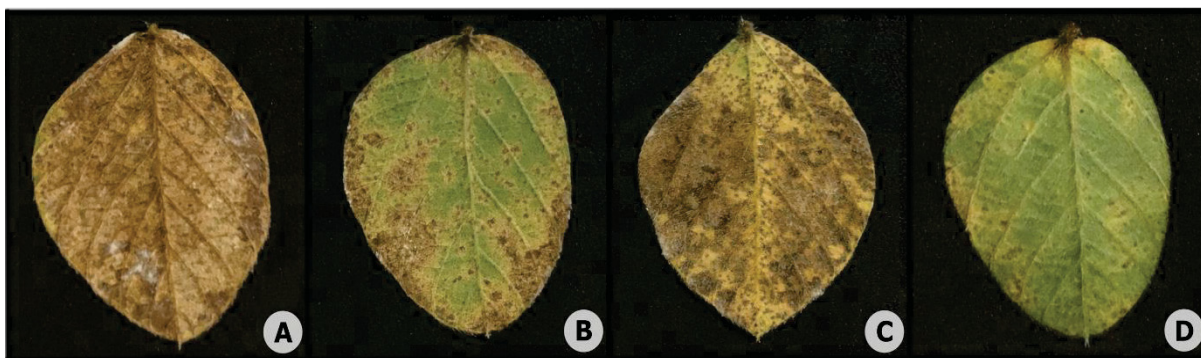
Fonte: O autor (2022).

Figura S1. Ilustração resumida de cada etapa das metodologias *in vitro* e em folha destacada. Ensaios em folha destacada com tratamentos realizados de forma preventiva e curativa por meio da imersão das folhas em calda; e com tratamentos pulverizados de forma preventiva em plantas de soja com equipamento do tipo CO₂.



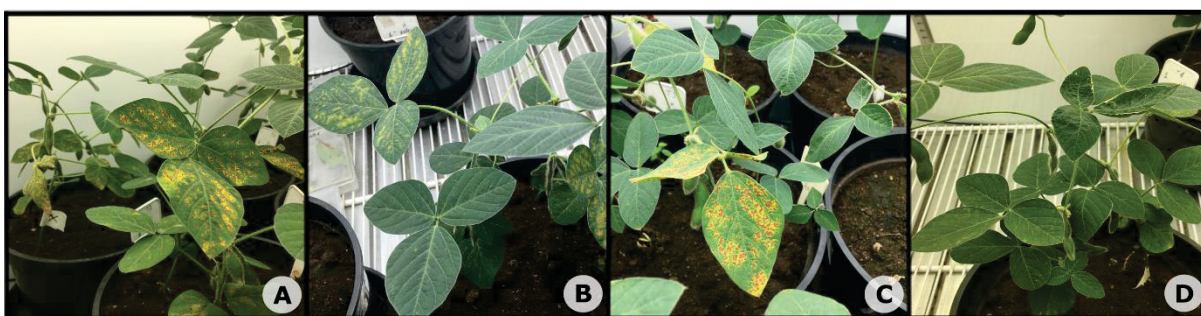
Fonte: O autor (2022).

Figura S2. Ilustração resumida de cada etapa das metodologias *in vivo*. Ensaios com tratamentos realizados de forma preventiva e curativa por meio da pulverização de plantas de soja com equipamento do tipo CO₂.



Fonte: O autor (2022).

Figura S3. Fotos do ensaio em folha destacadas após 15 dias da inoculação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Tratamentos curativos realizados por meio da imersão das folhas em calda 5 dias após a inoculação - DAI. **A** - NC (controle negativo - água). **B** - Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva). **C** - 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); **D** - Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva).



Fonte: O autor (2022).

Figura S4. Plantas do ensaio *in vivo* (experimento 2) após 15 dias da inoculação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Tratamentos realizados por meio da pulverização das plantas com equipamento do tipo CO₂. **A** - NC (controle negativo - água). **B** - Gly (glifosato sal dimetilamina, Glizmax Prime®, Corteva). **C** - 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Colex-D®, Corteva); **D** - Gly+2,4-D (glifosato sal dimetilamina + ácido 2,4-diclorofenoxiacético sal colina, Enlist Duo® Colex-D®, Corteva).

V CONSIDERAÇÕES GERAIS

Populações com a mutação *SdhC*-I86F apresentam penalidades adaptativas e, em condições de laboratório apresentam frequência da mutação estáveis por até 36 gerações. A população *WT_{SdhC}* em apenas uma geração na presença de fungicida SDHI passou a apresentar a mutação *SdhC*-I86F detectável. Genótipos *SdhC*-I86F foram mais sensíveis que ao mancozebe, se comparado com o *WT_{SdhC}*, indicando uma resistência cruzada negativa. Por isso, o uso de estratégias no manejo da doença a campo pode ser eficaz para reduzir a frequência de mutações. O vazio sanitário, calendário de cultivo, o uso do fungicida mancozebe, podem facilitar o manejo dessa resistência.

Os herbicidas glifosato+2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio reduziram a severidade do oídio quando aplicados em pós emergência da cultura da soja tolerante, e essa redução ocorre de forma sistêmica para novas folhas. Para a ferrugem asiática, os herbicidas glifosato+2,4-D, glifosato também apresentaram atividade de inibição, com redução na severidade e esporulação do patógeno. O cultivo da soja com a transgenia de tolerância a herbicidas que utilizamos poderá trazer benefícios ao manejo do oídio e ferrugem asiática da soja, e também para plantas daninhas.

Pelo nosso conhecimento, novas metodologias descritas nesse estudo não eram relatadas na literatura e poderão ser úteis em novos estudos. O uso do paraquate para avaliar o estresse oxidativo na germinação de esporos de *P. pachyrhizi* e, a metodologia da folha destacada para investigar da atividade de inibição de doenças com o uso de herbicidas aplicados com pulverizador do tipo CO₂. Esta última, poderá ainda servir para estudos de forma otimizada na área da fitopatologia e também na matologia para diversas culturas tolerantes.

Novos estudos sobre mutações de patógenos na cultura da soja e abordagens multidisciplinares são necessárias para um melhor entendimento das interações herbicida x patógeno x hospedeiro x ambiente em um sistema produtivo e, podem trazer grandes avanços na agricultura e no desenvolvimento de novos produtos e biotecnologias.

REFERÊNCIAS GERAIS

- Altman, J., Campbell, C. L. 1977. Effect of herbicides on plant diseases. *Annu Rev Phytopathol.* 15:361–385.
- Barroso, A. A. M., Murata, A. T. (org.). **Matologia**: estudos sobre plantas daninhas. Curitiba: UFPR, 2021. 547 p. ISBN 978-65-00-16757-3.
- Casale, W. L., Hart, L. P. 1986. Influence of four herbicides on carpogenic germination and apothecium development of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathol* 76:980–984
- Cassman, K. G., Grassini, P. 2020. A global perspective on sustainable intensification research. *Nat. Sustain.* 3, 262–268.
- Chauhan, B. S. 2020. Grand Challenges in Weed Management. *Front. Agron.* 1:3. doi: 10.3389/fagro.2019.00003.
- CIB - Conselho De Informações Sobre Biotecnologia. Produtos Aprovados. Online. 2021. Disponível em: < <https://cib.org.br/produtos-aprovados/> >. Acesso em: 10 dez. 2021.
- Claus, A., Simões, K., Mio, May De Mio, L. L. 2022. *SdhC*-I86F mutation in *Phakopsora pachyrhizi* is stable and can be related to fitness penalties. *Phytopathology*. First Look, 26 jan. 2022 (*in press*). <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-10-21-0419-r>.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Safra Brasileira de Grãos. 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 17 dez. 2021.
- Dunn, M. W., Gaynor, L. G. 2020. Impact and Control of powdery mildew on Irrigated Soybean Varieties Grown in Southeast Australia. *Agron.*, 10, 514. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040514>.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat>. Acesso em 10 dezembro 2021.
- Gazziero, D. L. P., Adegas, F. S., Silva, A. F., Concenço, G. 2019. Estimating yield losses in soybean due to sourgrass interference. *Planta Daninha*, v. 37. doi.org/10.1590/s0100-83582019370100047.
- Godoy, C.V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Guimarães, F. C. M., Meyer, M. C.,

- Costamilan, L. 2016. Asian Soybean Rust in Brazil: Past, Present, and Future. *Pesqui. Agropecu. Bras.* V. 51, N. 5, P. 407-421.
- Hartman, G. L., West, E. D., Herman, T. K. 2021. Crops that feed the World 2. Soybean worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Sec.* 3, 5–17. doi.org/10.1007/s12571-010-0108-x.
- Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. Acesso em 10 dez 2021. Disponível em: www.weedscience.org.
- Igarashi, S. Oliveira, G. M., Camargo, L. C. M., Falkoski Filho, J., Gardiano, C. G., Balan, M. G. 2010. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. *Arq. Inst. Biol.*, v. 77, n. 2, p. 245-250. doi.org/10.1590/1808-1657v77p2452010.
- ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. 2021. GM Crop Events approved in Brazil. Disponível em: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>. Acesso em: 18 nov. 2021.
- Kao, H. Y., Chung, K. R., Huang, J. W. Paraquat and glyphosate increase severity of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Gen Plant Pathol* 85, 23–32 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0823-2>
- Kashiwa, T., Muraki, Y., Yamanaka, N. 2020. Near-isogenic soybean lines carrying Asian soybean rust resistance genes for practical pathogenicity validation. *Sci Rep.* 10, 13270. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70188-7>
- Klosowski, A. C., May De Mio, L. L., Miessner, S., Rodrigues, R., Stammler, G. 2015. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Manag. Sci.* v. 72, p. 1211-1215.
- Kortekamp, A. 2011. Herbicides and environment. InTech, Rijeka, Croatia. <https://library.umac.mo/ebooks/b28109740.pdf>.
- Müller, M. A., Stammler, G., May De Mio, L. L. 2021. Multiple resistance to DMI, QoI and SDHI fungicides in field isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Crop Protection*. ISSN 0261-2194. doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105618.
- Paxton, J. D., Rogers, D., P., 1974. Powdery mildew of soybeans. *Mycologia*. 66:894-896.

- Sanyal, D., Shrestha, A. 2008. Direct effect of herbicides on plant pathogens and disease development in various cropping systems. *Weed Sci.* 56:155–16 <https://doi.org/10.1614/WS07081.1>.
- Sardrood, P. B., Goltapeh, M. E. 2018. Weeds, Herbicides and Plant Disease Management. In: Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 31. *Sustain. Agric. Res.* vol 31. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-319-94232-23.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., Mc Roberts, N., Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol.* 3(3):430-439. doi: 10.1038/s41559-018-0793-y.
- Schmitz, H. K., Medeiros, C. Craig, I. R., Stammer, G. 2013. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards Qo inhibitors and demethylation inhibitors, and corresponding resistance. *Pest Manag Sci.* n. 70, p. 378-388.
- Simões, K., Hawlik, A., Rehfus, A., Gava, F., Stammer, G. 2017. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *J. Plant Dis. Protect.* v. 125, p. 21-26.
- Song, X. P., Hansen, M. C., Potapov, P., Adusei, B., Pickering, J., Adami, M., Lima, A., Zalles, V., Stehman, S. V., Di Bella, C. M., Conde, M. C., Copati, E. J., Fernandes, L. B., Hernandez-Serna, A., Jantz, S. M., Pickens A. H., Turubanova, S., Tyukavin A. 2021. Massive soybean expansion in South America since 2000 and implications for conservation. *Nat Sustain.* 4, 784–792. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00729-z>.
- Tai, F. L. 1979. *Phakopsora pachyrhizi* Syd. In: Sylloge fungorum sinicorum, 1979, Poeking. Proceedings...Poeking: Science Press, Academia Sinica.
- Reis, E. M., Medeiros, C. A., Casa, R. T. 1997. Epidemia de oídio da soja, causada por *Microsphaera diffusa*, na safra 1996/ 97, no RS. *Fitopatol. Bras.*, 1997 v. 22, p. 300-301.
- Yorinori, J. T., Paiva, W. M., Frederick, R. D., Costamilan, L. M., Bertagnolli, P. F., Hartman, G. E., Godoy, C. V., Nunes, J., Jr. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Dis.* 89:675-677.