

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

PRISCILA SANTOS CASADO

**Validação do método de microplaca e estudos sobre a resistência ao fungicida
fluxapiraxade em populações de *Pyricularia graminis-tritici* no Brasil**

Ilha Solteira
2017

PRISCILA SANTOS CASADO

**Validação do método de microplaca e estudos sobre a resistência ao fungicida
fluxapiraxade em populações de *Pyricularia graminis-tritici* no Brasil**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia – UNESP – Campus de Ilha
Solteira, como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Agronomia.

Especialidades: Sistema de Produção

Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

Orientador

Prof.^a Dr.^a. Giselle de Carvalho

Prof.^o Dr. Omar José Sabbag

Coorientadores

Ilha Solteira
2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

C334v Casado, Priscila Santos.
Validação do método de microplaca e estudos sobre a resistência ao fungicida fluxapiroxade em populações de *Pyricularia graminis-tritici* no Brasil / Priscila Santos Casado. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2017
53 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2017

Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Co-orientador: Giselle de Carvalho, Omar José Sabbag
Inclui bibliografia

1. Método rápido. 2. Acurado. 3. Resistência a fungicida. 4. Mutação. 5. Seleção natural.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Validação do método de microplaca e estudos
sobre resistência ao fungicida fluxapirroxade em
populações de Pyricularia graminis - tritici no Brasil.

AUTORA: PRISCILA SANTOS CASADO

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

COORDINADOR: OMAR JORGE SABBAG

COORDINADORA: GISELLE DE CARVALHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA,
especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:

Giselle de Carvalho

Profa. Dra. GISELLE DE CARVALHO
Pós-Doutoranda - DEFERS / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Ana Carolina Firmino

Profa. Dra. ANA CAROLINA FIRMINO
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Marco Antonio Basseto

Dr. MARCO ANTONIO BASSETO
Coordenadoria de Defesa Agropecuária de Araçatuba / Secretaria de Agricultura e Abastecimento

Alcebíades R. Seixas Campos

Ilha Solteira, 31 de agosto de 2017.

Aos meus pais Carlos e Valderez Casado, ao meu irmão Rafael Casado, e aos meus sobrinhos Eduardo e Guilherme que foram essenciais nessa etapa da minha vida. E principalmente aos meus avôs Olinto Ribeiro e Manoel Moelas (*In Memoriam*) que com toda certeza iriam se orgulhar de mais uma conquista.

AGRADECIMENTOS

Sempre agradecer a Deus, pois é para ele que rezo todas as noites para ter sabedoria para continuar no dia seguinte.

Aos meus pais Carlos e Valderez que sempre me apoiaram e fizeram de tudo para eu estar aqui, me incentivando a continuar e acreditando no meu potencial me mostrando exemplos de perseverança e determinação, pois tudo que sou é graças ao carinho, amor e dedicação que juntos estamos construindo um caminho melhor para seguir.

Ao meu irmão Rafael que sempre se mostrou atencioso para me ouvir e me incentivar.

Ao meu orientador Professor Paulo Cezar Ceresini que me auxiliou para que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível.

Aos meus Co orientadores, Dra. Giselle de Carvalho e Prof. Dr. Omar Sabbag, que estiveram presentes em toda a execução deste trabalho, me apoiando e auxiliando a superar todas as dificuldades que a vida acadêmica proporciona.

Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia e Genética Molecular, Dra. Vanina Castroagudín, Msc. Nadia Poloni, Adriano Dorigan, Samara Vicentini, Suelen Moreira, obrigado por estarem comigo até o final da execução deste trabalho. A todos os meus amigos que a UNESP tem o dom de proporcionar e que levarei por toda minha vida.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado na UNESP (Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”) *campus* de Ilha Solteira.

OBRIGADA

“Não existe triunfo sem perda,
Não há vitória sem sofrimento,
Não há liberdade sem sacrifício”
(O Senhor dos Anéis – O Retorno do Rei)

RESUMO

Na primeira etapa da nossa pesquisa propusemos e testamos a utilização de um método baseado em leitor automatizado de microplacas para detectar resistência a fungicidas em populações do fungo hemibiotrófico fitopatogênico *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt) associado à brusone do trigo no Brasil. A disponibilidade de um método mais rápido, acurado e eficiente para detecção de resistência a fungicidas facilitaria a tomada de decisão sobre o manejo químico da brusone do trigo no país. Como há indícios da ineficácia de fungicidas triazóis (DMI) no controle da brusone do trigo e evidências da ocorrência generalizada de resistência a estrobilurinas (QoI) em populações de Pygt no Brasil, inicialmente, testou-se a aplicação do método de microplacas para detecção de resistência a estes dois grupos de fungicidas. O método de microplaca foi acurado em discriminar a variação fenotípica na sensibilidade entre isolados do patógeno aos fungicidas DMI tebuconazol e epoxiconazol e ao fungicida QoI azoxistrobina. Economicamente, ambos os métodos representam um alto investimento inicial. Portanto, é necessário analisar, de forma integral, as necessidades de cada laboratório ou grupo de pesquisa quanto à aquisição dos equipamentos necessários para a fenotipagem visando detecção de resistência a fungicidas em atividades de rotina. Na segunda etapa do nosso estudo buscou-se evidências de resistência ao fungicida SDHI fluxapiroxade em populações de Pygt. Para se estabelecer o *baseline* de populações do patógeno da brusone do trigo ao fungicida fluxapiroxade, determinou-se a distribuição de frequência de padrões de sensibilidade, com base na EC₅₀ (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial fúngico) de cada isolado. Fenótipos extremos de sensibilidade e resistência a fluxapiroxade foram detectados nas diferentes populações do patógeno. Considerando que os fungicidas da segunda geração de SDHI são de alto risco para desenvolvimento de resistência em populações de fipatógenos, é necessária a avaliação do registro e recomendação de uso contínuo do fluxapiroxade, como único princípio ativo numa formulação para o manejo da brusone e de outras doenças do trigo no Brasil. Como estratégia anti-emergência para evitar resistência a SDHI, esse fungicida só poderia ser registrado em co-formulações com outro princípio ativo de baixo risco para resistência.

Palavras-chave: Método rápido. Acurado. Resistência a fungicidas. Mutação. Seleção natural.

ABSTRACT

In the first part of our study, we proposed and tested the use of an automated microplate reader to detect resistance to fungicides in populations of the plant pathogenic hemibiotrophic fungus *Pyricularia graminis-tritici* (*Pygt*) associated with the wheat blast disease in Brazil. The availability of a faster, more accurate and efficient method for detecting resistance to fungicides would facilitate the decision making on the chemical management of wheat blast in the country. Because there is indication of inefficacy of triazole fungicides (DMI) for wheat blast control and evidence of the widespread occurrence of strobilurin (QoI) resistance in pathogen populations in Brazil, initially, we tested the application of the microplate method for detecting resistance to these two fungicide groups. The microplate method was accurate in discriminating the phenotypic variation in sensitivity between isolates of the pathogen to the fungicides DMI tebuconazole and epoxiconazole and the fungicide QoI azoxystrobin. Economically, both methods require a high initial investment. Therefore, it is necessary to fully analyze the needs of each laboratory or research group regarding the acquisition of the equipments necessary for phenotyping to detect resistance to fungicides in routine activities. In the second part of our study, using the microplate method, we searched for evidence of resistance to the SDHI fungicide fluxapirroxade in populations of *Pygt*. To establish the baseline of populations of the wheat blast pathogen to fluxapirroxade, the frequency distribution of sensitivity patterns was determined based on the EC₅₀ (concentration sufficient to inhibit 50% mycelial fungal growth) of each isolate. Extreme phenotypes of sensitivity and resistance to fluxapirroxade were detected in the different pathogen populations. Whereas the second generation of SDHI fungicides are at high risk for development of resistance in populations of plant pathogens, it is necessary to review the labeling and recommendation of continuous application of fluxapyroxad, as the sole active ingredient in any formulation for chemical management of wheat blast and other wheat diseases in Brazil. As an anti-emergence strategy to avoid the resistance to SDHI, this fungicide could only be labeled in co-formulations with another active ingredient of low risk for resistance.

Keywords: Fast. Accurate method. Resistance to fungicides. Mutation. Natural selection.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REFERÊNCIA.....	13
Capítulo 1. Método eficiente para detecção da resistência a fungicidas DMI's e QoI em populações de <i>Pyricularia graminis-tritici</i> do trigo baseado em leitores de microplaca	
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 MATERIAIS E METODOS.....	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
4 CONCLUSÕES.....	35
5 REFERÊNCIA.....	36
Capítulo 2. Evidência de resistência ao fungicida fluxapiroxade, um inibidor de succinato desidrogenase (SDHI) em populações de <i>Pyricularia graminis-tritici</i> da brusone do trigo no Brasil	
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 HIPOTÉSES.....	43
3 MATERIAIS E METODOS.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
5 CONCLUSÕES.....	49
6 AGRADECIMENTO.....	49
7 REFERÊNCIA.....	49

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a brusone de trigo foi descoberta em 1985 no estado do Paraná (IGARASHI et al. 1986), tendo se tornado uma doença de elevada importância para a agricultura brasileira, podendo ocasionar perdas de 40 a 100% na cultura (GOULART; PAIVA et al. 2000). A doença é causada pelo fungo ascomiceto hemibiotrófico *Pyricularia graminis-tritici*, espécie filogeneticamente próxima de *P. oryzae* da brusone do arroz (CASTROAGUDÍN et al. 2016).

Desde a sua descoberta, a brusone do trigo se espalhou por todas as áreas de cultivo no Brasil (ANJOS et al., 1996; SILVA et al., 2009; KOHLI et al., 2011; MACIEL et al., 2011; CASTROAGUDÍN et al., 2015) e na América Latina. No Brasil, além do Paraná, historicamente foi relatada no estado de São Paulo (IGARASHI et al. 1990), em Mato Grosso do Sul (GOULART et al. 1990), no Rio Grande do Sul (PICININI et al. 1990) e nos Cerrados de Minas Gerais, Goiás e Brasília, DF (ANJOS et al. 1996). Na América Latina, a doença é encontrada na Bolívia, na Argentina e no Paraguai (DUVEILLER et al., 2010). Em 2016 foi introduzida em Bangladesh, no sudeste da Ásia, e notícias recentes de 2017 indicam que ela foi detectada na Índia em áreas próximas às da epidemia em (CALLAWAY, 2016; CROLL, 2016; ISLAM et al., 2016). Nos Estados Unidos a brusone do trigo é classificada como uma das principais doenças quarentenárias (KOHLI et al., 2011) e, mundialmente, é considerada uma ameaça para o cultivo de trigo em áreas livres de doenças da Ásia, da Europa e da América do Norte (McTAGGART et al., 2016).

Os sintomas da brusone do trigo incluem o esbraquiçamento das espigas a partir do ponto de infecção do fungo, acarretando sua morte e consequente perda direta de produção. O fungo sobrevive em restos de culturas, sementes e outros hospedeiros secundários (URASHIMA et al., 1994).

Pela ausência de resistência durável à brusone nas cultivares de trigo, o principal componente para o manejo integrado da doença é a pulverização de fungicidas dirigida às espigas (GOULART et al., 2007). No entanto, há consenso de que a eficácia das pulverizações de fungicidas no controle da brusone do trigo no país é consideravelmente baixa (PAGANI et al. 2014). Essa baixa eficácia dos fungicidas é atribuída a vários fatores: a) tecnologia de pulverização inapropriada para cobertura e proteção adequada das espigas; b) alta suscetibilidade das cultivares de trigo e baixa durabilidade da resistência varietal; c) condições climáticas bastante favoráveis para o desenvolvimento da doença; d) dificuldade de se prever o momento adequado de pulverizar, pois se desconhece as fontes primárias de

inóculo; e) alta variação genética nas populações do patógeno, especialmente de grupos de virulência; e finalmente, mas muito importante f) a ocorrência generalizada de resistência aos dois dos principais grupos de fungicidas curativos comercialmente disponíveis: triazóis e estrobirulinas (CASTROAGUDÍN et al. 2015; MACIEL 2011; POLONI et al 2016).

O cenário atual da resistência a fungicidas na agricultura brasileira é um problema generalizado que não está somente restrito à brusone do trigo. Não há, praticamente, quaisquer relatos de iniciativas para implementação de um sistema local de monitoramento e detecção como estratégia para deter a emergência da resistência e os sérios impactos pós-emergência associados com a queda de eficácia dos fungicidas em culturas de importância agrícola (VAN DEN BOSCH et al., 2014).

A viabilização da implementação de um sistema de monitoramento e detecção da resistência a fungicidas em fungos fitopatogênicos no país depende do desenvolvimento de métodos acurados, rápidos e eficientes de detecção (FRAAIJE et al., 2007), que são escassos. Portanto, na primeira parte desta pesquisa, propõe-se testar a aplicação de um método baseado em leitor automatizado de microplacas para detectar resistência em populações do fungo ascomiceto hemibiotrófico *P. graminis-tritici*, a dois tipos de fungicidas amplamente utilizados no Brasil para o controle de doenças foliares no trigo (triazóis e estrobirulinas). A disponibilidade de um método mais rápido, acurado e eficiente para detecção de resistência a fungicidas contribuiria para facilitar a tomada de decisão sobre o manejo químico da brusone do trigo no país (VAN DEN BOSCH et al., 2014).

Em etapa seguinte, estendeu-se a aplicação do método de microplaca para detecção de resistência a fluxapirroxade, um fungicida registrado recentemente pertencente à segunda geração da classe dos inibidores da succinato desidrogenase (SDHI). Os fungicidas SDHI foram lançados na década de 60 para o controle de fungos basidiomicetos e englobam o grupo das carboxinas. Recentemente, fungicidas SDHI de segunda geração foram registrados e lançados no mercado mundial, e também no brasileiro, para controle de doenças causadas, também, por fungos ascomicetos, (SCALLIET et al., 2012). Esse grupo de fungicidas engloba diferentes princípios ativos como fluxapirroxade, pentiopirade, fluopirame e outros (AVENOT & MICHAILIDES, 2010). O alvo de ação dos SDHIs é o complexo succinato desidrogenase (SDH) presente na cadeia respiratória mitocondrial, também referido como complexo II (MYAMOTO et al., 2010). Assim impedem a respiração dos fungos referente ao seu comportamento sobre a enzima da succinato desidrogenase, impossibilitando a cadeia transportadora de elétrons mitocondriais. Os SDHIs são protetores, sistêmicos ou

translaminares (McKAY et al., 2011). Pelo sítio específico de ação, são considerados fungicidas de alto risco para seleção de resistência em populações de fitopatógenos alvos (MIYAMOTO et al., 2010).

Dessa forma, na segunda etapa de nossa pesquisa objetivou-se determinar o *baseline* de populações de *P. graminis-tritici* do trigo, com base na EC₅₀ (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial fúngico), descrevendo a distribuição de frequência da sensibilidade de populações do patógeno ao fungicida SDHI fluxapiroxade.

2 REFERÊNCIAS

ANJOS, J.R.N. et al. Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos cerrados do Brasil Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.31, n.1, p.79-82, 1996.

CALLAWAY, E. Devastating wheat fungus appears in Asia for first time. **Nature**, Washington, v. 532, p. 421-422, 2016.

CASTROAGUDIN V.L. et al. Resistance to QoI fungicides Is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.105, 284-94, 2015.

CROL, D. **The origin of wheat blast in Bangladesh**. Disponível em: <<http://github.com/crolllab/wheat-blast>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

DUVEILLER, E. et al. Wheat blast caused by *Magnaporthe grisea*: a reality and new challenge for wheat research. INTERNATIONAL. WHEAT CONFERENCE, 8, 2010, St. Petersburg. **Conference...** St. Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry, 2010. p. 247-248.

FRAAIJE, B. A. et al. A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 8, n. 3, p. 245-54, 2007.

GOULART, A. C. P. et al. Manejo integrado de doenças em trigo irrigado sob pivô central na região do cerrado. **Summa Phytopathologica.**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 358-363, 2007.

GOULART, A. C. P. et al. Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*) em Mato Grosso do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 15, n. 1, p. 112-114, 1990.

IGARASHI, S. Update on wheat blast (*Pyricularia oryzae*) in Brazil. In: SAUNDERS, D. A. (Ed.). **Wheat for nontraditional warm areas**: a proceeding of the International Conference, Foz do Iguaçu, Brazil, 1990. p. 480-483.

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

ISLAM, M. T. et al. Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. **BMC Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 84, 2016.

KOHLI, M. M. et al. *Pyricularia* blast - a threat to wheat cultivation. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, Prague, v. 47, p. S130-S134, 2011.

MACIEL J. L. N. et al. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology** St. Paul, v. 104, p. 95-107, 2014.

MACIEL, J. L. N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **Plant Science Review**, v. 2011, p. 233-240, 2011.

MCKAY, A. H. et al Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicide resistance prevention strategy. **New Zeland Plant Protection**, Henderson, v. 64, p. 119-124, 2011.

McTAGGART, A. R. et al. Fungal genomics challenges the dogma of name-based biosecurity. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, p. e1005475, 2016.

MIYAMOTO, T. et al. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid, **Plant Pathology**, West Sussex, v. 59, n. 5, p. 873-881, 2010.

PAGANI, A. P. et al. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 42, n. 5, p. 609-617, 2014.

PICININI, E. C. et al. Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em lavouras comerciais de trigo (*Triticum aestivum*) no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.15, n.1, p.83-84, 1990.

POLONI, N. M. **Distribuição pervasiva da resistência a fungicidas triazóis e evolução do gene cyp51A em populações de *Pyricularia oryzae* da brusone do trigo no Brasil**. 2016. 39 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2016.

PRABHU, A. S. et al. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 387 p.

SILVA, C. P. et al. Efficiency of alternative treatments in the control of *Pyricularia grisea* in wheat seeds. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 127-131, 2009.

URASHIMA, A.S. et al. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.20, n.2, p.107-112, 1994.

VAN DEN BOSCH, F. et al. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 175-195, 2014.

Capítulo1. Método eficiente para detecção da resistência a fungicidas DMI's e QoI em populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo baseado em leitores de microplaca

RESUMO

A disponibilidade de um método mais rápido, acurado e eficiente para detecção de resistência a fungicidas contribuiria para facilitar a tomada de decisão sobre o manejo químico da brusone do trigo no país. Há indícios da ineficácia de triazóis no controle da brusone do trigo e evidências da ocorrência generalizada de resistência a estrobilurinas em populações do patógeno no Brasil. Esta pesquisa propõe a utilização de um método baseado em leitor automatizado de microplacas para detectar resistência a fungicidas triazóis (DMI) e estrobilurinas (QoI) em populações do fungo hemibiotrófico fitopatogênico *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt) associado à brusone do trigo. O método de microplaca foi acurado em discriminar a variação fenotípica na sensibilidade entre isolados do patógeno aos fungicidas DMI tebuconazol e epoxiconazol e ao fungicida QoI azoxistrobina. Economicamente, comparando-se o método convencional de placa de Petri com o método de microplacas, ambos representam um alto investimento inicial. Portanto, é necessário analisar, de forma integral, as necessidades de cada laboratório ou grupo de pesquisa quanto à aquisição dos equipamentos necessários para a fenotipagem visando detecção de resistência a fungicidas em atividades de rotina. O método de microplacas foi mais eficiente no uso de recursos, com custo operacional total 33% inferior ao do método de placas de Petri. Em conjunto, os fatores rapidez, acurácia e eficiência no uso de recursos indicam que o método de microplaca pode ser incorporado no desenvolvimento de um sistema de monitoramento de resistência a fungicidas em populações do fungo da brusone do trigo no agroecossistema brasileiro.

Palavras-chave: EC₅₀. Acurácia. Rapidez. Eficiência. Manejo. Custos.

ABSTRACT

The availability of a faster, more accurate and efficient method for detecting fungicide resistance would help to facilitate decision making on the chemical handling of wheat blast in the country. There are indications of triazole inefficiency in wheat blast control and evidence of the widespread occurrence of strobilurin resistance in pathogen populations in Brazil. This research proposes the use of an automated microplate reader to detect resistance to triazole fungicides (DMI) and strobirulins (QoI) in populations of the phytopathogenic hemibiotrophic fungus *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt) associated with wheat blast. The microplate method was accurate in discriminating the phenotypic variation in sensitivity between isolates of the pathogen to the fungicides DMI tebuconazole and epoxiconazole and the fungicide QoI azoxystrobin. Economically, by comparing the conventional Petri dish method with the microplate method, both represent a high initial investment. Therefore, it is necessary to analyze, in an integral way, the needs of each laboratory or research group regarding the acquisition of the equipment necessary for phenotyping to detect resistance to fungicides in routine activities. The microplate method was more efficient in the use of resources, with a total operating cost of 33% lower than that of the Petri dish method. Taken together, the factors of speed, accuracy and resource efficiency indicate that the microplate method can be incorporated into the development of a fungicide resistance monitoring system in populations of the wheat blast fungus in the Brazilian agroecosystem.

Keywords: EC50. Accuracy. Quickness. Efficiency. Management. Costs.

1. INTRODUÇÃO

Desde os anos 70, o número de casos de fungos fitopatogênicos resistentes a fungicidas vem aumentando consideravelmente na agricultura, tornando-se um fator limitante a prejudicar o manejo químico de doenças nas culturas, uma vez que os fungicidas se tornam ineficazes (ESTEP et al., 2015). Surpreendentemente, no Brasil as contribuições de pesquisa para revelar a magnitude do impacto da resistência de fungicidas nos mais diversos patossistemas locais têm sido escassas, limitando-se a revisões de literatura ou a estudos pontuais (CASTROAGUDÍN et al., 2015; DEISING et al., 2008; FORCELINI et al., 2001). Talvez por essa escassez de informação sobre o cenário atual da resistência a fungicidas na agricultura brasileira, não há relatos de qualquer iniciativa para implementação de um sistema local de monitoramento como estratégia para deter a emergência da resistência e os sérios impactos pós-emergência associados com a queda de eficácia dos fungicidas em culturas de importância agrícola (VAN DEN BOSH et al., 2014).

Mesmo mundialmente são escassos os exemplos de sistemas de monitoramento da resistência a fungicidas em populações de fitopatógenos na agricultura que possibilitem aos produtores de determinada cultura a tomada de decisão, em tempo real, em substituir fungicidas na eventualidade da constatação de resistência a princípios ativos de alto risco. Como exceção à regra, o Reino Unido desenvolveu e implementou o único sistema de detecção e monitoramento, em tempo real, da resistência a fungicidas em populações de fitopatógenos do trigo (LUCAS et al., 2015).

A viabilização da implementação de um sistema semelhante de monitoramento da resistência a fungicidas em fungos fitopatogênicos no país depende do desenvolvimento de métodos acurados, rápidos e eficientes de detecção (FRAAIJE et al., 2007). Há vários métodos convencionais utilizados para detecção e monitoramento da variação fenotípica na sensibilidade de fungos necrotróficos e hemi-biotróficos a fungicidas, visando evidenciar a ocorrência de resistência em populações de fitopatógenos. Esses métodos convencionais são baseados na análise relativa do crescimento fúngico micelial “*in vitro*” em meios de cultura suplementados com doses discriminatórias de fungicidas ou com doses seriadas para determinar-se o EC₅₀ (concentração efetiva do fungicida capaz de inibir 50% do crescimento micelial fúngico) populacional (COOLS et al., 2012; COOLS et al., 2010; LEROUX et al., 2007). Entretanto, os métodos convencionais são, em sua maioria, muito demorados, pouco acurados devido à dependência de critérios visuais e manuais nas avaliações, e ineficientes no

uso de recursos requerendo centenas a milhares de placas de Petri de meio de cultura (BAMPI et al., 2013). São potencialmente mais prejudiciais ao meio ambiente em função da geração de maior quantidade de material de descarte com resíduos tóxicos de fungicidas (ARIKAN et al., 2007; PANEK et al., 2016; REKANOVIC et al., 2010).

Para acelerar o processo de detecção da resistência a fungicidas em populações de fitopatógenos propôs-se o uso do método de microplacas otimizado para esta finalidade específica (FRAAIJE et al., 2012). O método de microplacas é baseado na medida simples da biomassa fúngica ou da atividade cinético-microbiana em resposta ao efeito de diferentes doses de fungicidas (BOTELHO et al., 2013; BROEKAERT et al., 1990; LOURENÇO et al., 2011; LUDWING et al., 1990). O fungo é cultivado em meio de cultura líquido em um poço da microplaca e o crescimento ou a atividade cinética microbiana são medidos por meio da absorvância de luz que resulta da variação da turbidez ou da intensidade de fluorescência em decorrência do ataque enzimático a um substrato específico (BOTELHO et al., 2013; BROEKAERT et al., 1990; LOURENÇO et al., 2011; PINTO et al., 2010). Como a avaliação da inibição do crescimento fúngico na presença de fungicidas se baseia no uso de tecnologia de leitura automatizada da absorvância de luz em dezenas de amostras simultaneamente, esse método é potencialmente mais rápido, mais acurado e mais eficiente. Isso porque leitores de microplacas possuem sistemas operacionais que reduzem o tempo envolvido no tratamento de dados, uma vez que se baseiam em leitura de valores de absorvância e cálculos da resposta fenotípica de maneira automática (BOTELHO et al., 2013; LOURENÇO et al., 2011).

Como referencial para implementar o método de microplacas para detecção de resistência a fungicidas em um patossistema fúngico particular recomenda-se que: i) o volume total de solução dentro de cada poço da microplaca deve estar entre 75 e 200 μL , ii) a concentração inicial da suspensão de esporos fúngicos deve estar no mínimo a 10^4 esporos mL^{-1} e iii) o comprimento de onda utilizado para a leitura da absorvância deve ser especificamente adaptado para cada fungo fitopatogênico e sistema específico de detecção (FRAAIJE et al., 2007; LUCAS et al., 2015).

Se a otimização do método de microplacas para detecção e monitoramento da resistência a fungicidas em populações do fungo da brusone do trigo for bem-sucedida, poderá ser utilizada para nortear a tomada de decisão, em tempo real (i.e., durante a própria safra), sobre o manejo químico dessa doença foliar tão importante para agricultura brasileira.

A brusone é considerada a principal doença do trigo no Brasil, e há indícios da ineficácia de triazóis e evidências da ocorrência generalizada de resistência a estrobilurinas em populações do patógeno no Brasil. No presente estudo, propôs-se o desenvolvimento do método de microplaca para a medida do crescimento fúngico como virtualmente mais rápido, acurado e eficiente para discriminar e quantificar a resistência ou sensibilidade das populações do fungo fitopatogênico *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt), agente causal da brusone do trigo no Brasil, aos fungicidas triazóis [ou inibidores da desmetilação de esteróis (DMI)] tebuconazol e epoxiconazol e à estrobilurina [ou inibidores da quinona externa (QoI)] azoxistrobina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir esse objetivo específico, foram efetuadas: i) análise da acurácia do método em discriminar os fenótipos de resistência e sensibilidade de populações de Pygt da brusone do trigo aos fungicidas DMI e QoI com base na EC₅₀; ii) análise do rendimento relativo do método de microplacas em relação ao método de placas de Petri, considerando o número efetivo de amostras analisadas num tempo fixo (como medida de rapidez); e iii) análise econômica comparativa entre os métodos de microplaca e de placa de Petri, usando estimativas do custo operacional total como medida de eficiência do método proposto.

Os isolados do patógeno utilizados nesse estudo foram obtidos de amostras populacionais de *P. graminis-tritici* (Pygt) da brusone do trigo e de *P. oryzae* (Po) do arroz provenientes de Mato Grosso do Sul (MS) e Goiás (GO) no Centro-Sul do Brasil nos anos de 2007, 2012 e 2013, os quais se encontram preservados em nossa micoteca (Tabela 1). No total foram utilizados treze isolados de Pygt do trigo, além de quatro isolados de Po do arroz obtidos do Tocantins (TO). Os isolados de Po do arroz foram incluídos em nosso estudo pois representam o único grupo de isolados com padrão de sensibilidade a fungicidas triazóis DMI disponíveis em nosso laboratório (POLONI et al., 2016). Todos esses isolados representam diferentes genótipos multiloci microssatélites (CASTROAGUDIN et al., 2015) e haplotipos com mutações distintas nos genes *cyp51A* (*cyp51A* H1 ou *cyp51A* H6) ou *cytB* (*cytB* H1 ou *cytB* H9) que conferem fenótipo de sensibilidade ou resistência aos fungicidas DMI ou QoI, respectivamente ARIKAN, 2007; COOLS et al. 2010, COOLS et al., 2012).

A acurácia do método de microplacas em discriminar os fenótipos de resistência e sensibilidade *in vitro* aos fungicidas DMI tebuconazol e epoxiconazol e ao QoI azoxistrobina,

foi determinada comparando-se o fenótipo obtido para cada isolado analisado com aquele obtido anteriormente no método de placas de Petri (Tabela 1). Para implementação do método de microplacas, utilizou-se equipamento do tipo leitor de microplaca (MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo ScientificTM, EUA) de forma semelhante ao descrito por Fraaije *et al.* (2) para medida do crescimento, porém com modificações. Para comparação entre métodos, utilizou-se os dados fenotípicos qualitativos (Tabela 1) e quantitativos obtidos por Oliveira *et al.* (5) e Poloni *et al.* (6) que empregaram o método de placas de Petri na fenotipagem da resistência/sensibilidade dos mesmos isolados de *Pygt* da brusone do trigo aos fungicidas QoI e DMI, respectivamente.

Tabela 1. Descrição dos isolados de *Pyricularia graminis-tritici* e *P. oryzae* selecionados para analisar a acurácia do método de microplacas na discriminação dos fenótipos de resistência e sensibilidade a fungicidas triazóis (DMI) e estrobirulinas (QoI).

Espécie e isolados	Origem e safra de coleta	Haplotipo do gene <i>cyp51A</i> e fenótipo para fungicidas triazóis (DMI) ¹			Haplotipo do gene <i>cytB</i> e fenótipo para fungicidas estrobirulinas (QoI) ²		
		Haplotipo	NCBI	Fenótipo	Haplotipo	NCBI	Fenótipo
<i>Pyricularia graminis-tritici</i> de trigo							
12.1.129	MS	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível
12.1.132	(Amambai e	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível
12.1.130	Aral Moreira),	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível
12.1.150	2012/2013	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível
12.1.237		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível
12.1.239		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível
12.1.240		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível
12.1.280		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível
12.1.127		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente
12.1.146		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente
12.1.028	GO (Rio	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente
12.1.030	Verde),	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente
12.1.068	2012/2013	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente
<i>Pyricularia oryzae</i> ³							
630	TO, 2007	<i>cyp51A</i> H6	KX620437	Sensível	ND ⁴	-	ND
364		<i>cyp51A</i> H6	KX620437	Sensível			
704		<i>cyp51A</i> H6	KX620437	Sensível			
656		<i>cyp51A</i> H6	KX620437	Sensível			

¹ Caracterizados por Poloni (2016);

² Caracterizados por Castroagudin et al. (2015) e Oliveira et al. (2015).

³ Isolados de *P. oryzae* (Po) foram incluídos como controle pois não se detectou sensibilidade a fungicidas triazóis nas populações de isolados de *P. graminis-tritici*

⁴ ND Não determinado para este estudo uma vez que se detectou isolados de *Pygt* sensíveis para azoxistrobina. Entretanto, conhece-se que os isolados carregam o alelo *cytb H9* e são sensíveis à azoxistrobina Poloni (2016).

Os isolados de *Pygt* foram reativados em meio BDA (20,7 g L⁻¹ de batata dextrose, 15 g L⁻¹ ágar) e os isolados de *Po* foram reativados em meio de aveia (60 g L⁻¹ de aveia, 15 g L⁻¹ ágar), ambos com adição de cloranfenicol e estreptomicina (50 µg mL⁻¹ de cada). Após sete dias da reativação das culturas, transferiu-se discos de micélio para placas contendo meio BDA e incubou-se por quinze dias a temperatura de 24°C e 12 h de fotoperíodo. Para a coleta dos esporos foi realizada a raspagem superficial do micélio com o auxílio de uma espátula esterilizada na presença de água destilada esterilizada acrescida do espalhante adesivo Tween 80 (2 gotas L⁻¹). A concentração da suspensão de esporos foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, ajustando-se para 2 x 10⁴ esporos mL⁻¹.

O experimento consistiu na análise de treze isolados de *Pygt* e quatro isolados de *Po*. Para o grupo de fungicidas DMI tebuconazol e epoxiconazol foram utilizados os seguintes tratamentos: 13 isolados de trigo, quatro isolados de arroz, sete a nove doses dos fungicidas (Tabela 2), totalizando 127 parcelas experimentais cada. Para o fungicida QoI azoxistrobina foram utilizados os seguintes tratamentos: 13 isolados de trigo e 12 doses do fungicida (Tabela 2), totalizando 156 parcelas experimentais. O volume total dispensado em cada poço da placa foi de 130 µL, distribuídos como segue: controle positivo (120 µL de caldo BD sem adição dos fungicidas + 10 µL da suspensão de esporos), branco ou controle negativo (130 µL de caldo BD com adição das distintas doses de fungicidas) e as demais amostras (120 µL de caldo BD com adição das doses de fungicidas + 10 µL da suspensão de esporos).

Tabela 2. Concentrações utilizadas dos fungicidas Folicur EC (tebuconazol a 200g L⁻¹, Bayer), Tango Cash (epoxiconazol a 75g L⁻¹, BASF) e Priori (Azoxistrobina a 250g L⁻¹, Syngenta) para determinação da EC₅₀ de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de *P. oryzae* do arroz.

Espécie	Fungicidas	Doses (µg mL ⁻¹)							Total de doses
<i>Pyricularia graminis-tritici</i>	Tebuconazol	0,00	0,30	0,75	0,90	1,80	4,10	6,80	7
	Epoxiconazol	0,00	0,04	0,10	0,30	0,68	1,00	2,00	7
	Azoxistrobina	0,00	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,63	12
		1,25	2,50	5,00	7,00	10,00	-	-	

<i>P. oryzae</i>	Tebuconazol	0,0000	0,0025	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0750	9
		0,1500	0,3000	-	-	-	-	-	
	Epoconazol	0,0000	0,0013	0,0025	0,0050	0,0100	0,0200	0,0375	9
		0,0750	0,1120	-	-	-	-	-	

Para o experimento com fungicidas triazóis, a suspensão de esporos foi mantida por dezoito horas em câmara de crescimento a 24°C e 12 h de fotoperíodo para a pré-germinação dos esporos. No experimento com o fungicida azoxistrobina QoI, ao caldo BD (20,7 g L⁻¹ batata-dextrose) foi acrescido 0,5 mM de ácido salicil-hidroxiâmico (SHAM), fundamental para suprimir a via alternativa da oxidase acompanhando os procedimentos relatados por (3). As doses de fungicidas utilizadas foram pré-determinadas por um experimento piloto (Tabela 2).

O crescimento relativo dos isolados foi determinado com base na leitura de absorbância de luz medida à 620 nm no leitor de microplacas descrito acima, às 96 horas após o início do experimento. Os valores obtidos foram utilizados para cálculo da EC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento do micélio) de cada isolado, e para cada fungicida, por meio do programa ED50plus v1.0 (8).

Os experimentos consistiram de blocos casualizados, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi repetido duas vezes. A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5% de probabilidade, foram efetuados no ambiente R com o uso do pacote estatístico Agricolae (R_Core_Team., 2013).

A determinação da eficiência relativa no uso de recursos pelo método de microplacas e o de placas de Petri, foram determinados e os custos operacionais efetivo (COE) e total (COT) comparados, como proposto por Matsunaga (1976). O COE foi composto das despesas com mão-de-obra e materiais utilizados em laboratório para ambos os métodos. Já o COT foi composto pelo COE, acrescido de outras despesas calculadas como 5% do COE, bem como a depreciação estimada pelo método linear, proporcional ao período de utilização mensal do laboratório, em relação ao conjunto de elementos correspondentes ao capital fixo da atividade associados à vida útil de cada bem.

Essa informação é relevante tanto para os laboratórios interessados em implementar e oferecer serviços de detecção de resistência a fungicidas em populações de patógenos no país usando método semelhante de análise quanto para os produtores rurais, potenciais usuários

finais desse serviço de detecção, e que pagariam pelo serviço. Os preços empregados foram em moeda Dólar (US\$), referente ao dia 14 de julho de 2017.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Provavelmente este é o primeiro estudo em que se propõe o uso do método de microplaca (Figura 1) para discriminação entre os fenótipos de resistência e de sensibilidade a fungicidas triazóis e estrobirulinas em populações de *Pygt* e *Po*, com o objetivo de nortear a tomada de decisão quanto ao manejo químico da brusone do trigo no Brasil.

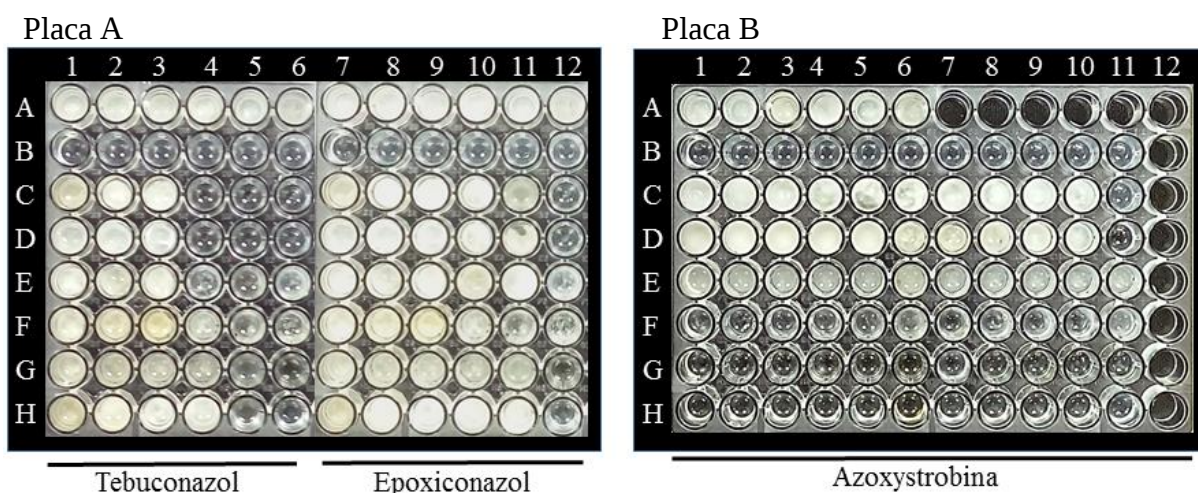


Figura 1. Representação visual do crescimento de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* *in vitro* em microplacas contendo caldo BD com diferentes concentrações dos fungicidas triazóis, tebuconazol e epoxiconazol (placa A) e azoxistrobina (placa B).

Placa A: Linha A, controle positivo contendo caldo BD sem o fungicida tebuconazol, com diferentes isolados de *Pygt* nas posições A1 a A6, e caldo BD sem o fungicida tebuconazol, com os mesmos isolados de *Pygt* nas posições de A7 a A12; linha B, controle negativo para isolados contendo caldo BD com doses diferentes dos fungicidas tebuconazol (posições B1 á B6) ou epoxiconazol (posições B7 à B12), descritas Tabela 2); linhas C a H, contém diferentes isolados de *Pygt* e os números de C1 a C6, ... , H1 a H6 representam as doses crescentes de tebuconazol, e de C7 a C12, ..., H7 a H12, doses crescentes do fungicida epoxiconazol.

Placa B: Linha A, controle positivo contendo caldo BD sem o fungicida azoxistrobina, com diferentes isolados de *Pygt* nas posições A1 a A6, e poços vazios nas posições A7 a A12; linha B, controle negativo para isolados com doses do fungicida azoxistrobina (posições B1 a B11); nas linhas C, D e E, isolados resistentes, linhas F, G e H, isolados sensíveis à azoxistrobina; e os números de 1 a 11 representam as doses crescentes de azoxistrobina.

Qualitativamente, o grupo de isolados de *Po* descritos como sensíveis aos fungicidas DMI triazóis pelo método de placas de Petri (6), também foi caracterizado como sensível quando avaliado pelo método de microplaca. Analisando-se a curva dose-resposta média para os grupos, foi possível discriminar o grupo de isolados de *Pygt* anteriormente descritos como resistentes a triazóis (6) do grupo dos isolados sensíveis de *Po*, demonstrando a acurácia do método de microplacas (Figura 2). Detectou-se, pelo método de microplacas, que os isolados de *Pygt* foram resistentes até as doses de 0,10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de epoxiconazol e 0,75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de tebuconazol. Para doses superiores dos fungicidas, observou-se que o crescimento desses isolados foi reduzido, mas não totalmente inibido. Os valores de absorbância da curva dose-resposta decresceram de 1,270 a 0,017 unidades de absorbância (DO620) em função do incremento de doses dos fungicidas triazóis. Os isolados de *Po* sensíveis a tebuconazol e epoxiconazol cresceram, no máximo, até a dose de 0,040 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 0,010 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente.

O método de microplacas foi também acurado em discriminar entre os grupos de isolados de *Pygt* sensíveis e resistentes à azoxistrobina (Figura 2). Individualmente os oito isolados de *Pygt* (12.1.129, 12.1.132, 12.1.130, 12.1.150, 12.1.237, 12.1.239, 12.1.240, 12.1.280) anteriormente classificados como sensíveis pelo método de placas de Petri (OLIVEIRA et al., 2015) apresentaram também sensibilidade à baixas doses de azoxistrobina pelo método das microplacas. Estes isolados apresentaram valores de absorbância para a curva dose-resposta decrescendo de 2,007 para 0 em função do incremento de doses do fungicida entre 0 e 0,16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de azoxistrobina. Por sua vez, os cinco isolados de *Pygt* (12.1.028, 12.1.030, 12.1.068, 12.1.127, 12.1.146) classificados por Poloni *et al.* (6), Oliveira *et al.* (5) como resistentes no método de placas de Petri foram também altamente resistentes no método de microplacas, tendo sido detectados valores de absorbância para a curva dose-resposta decrescendo de 1,120 para o mínimo de 0,003 na dose de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Verificou-se que esses isolados resistentes a azoxistrobina apresentam crescimento micelial em todas as doses do fungicida, o que não ocorreu com aqueles isolados sensíveis.

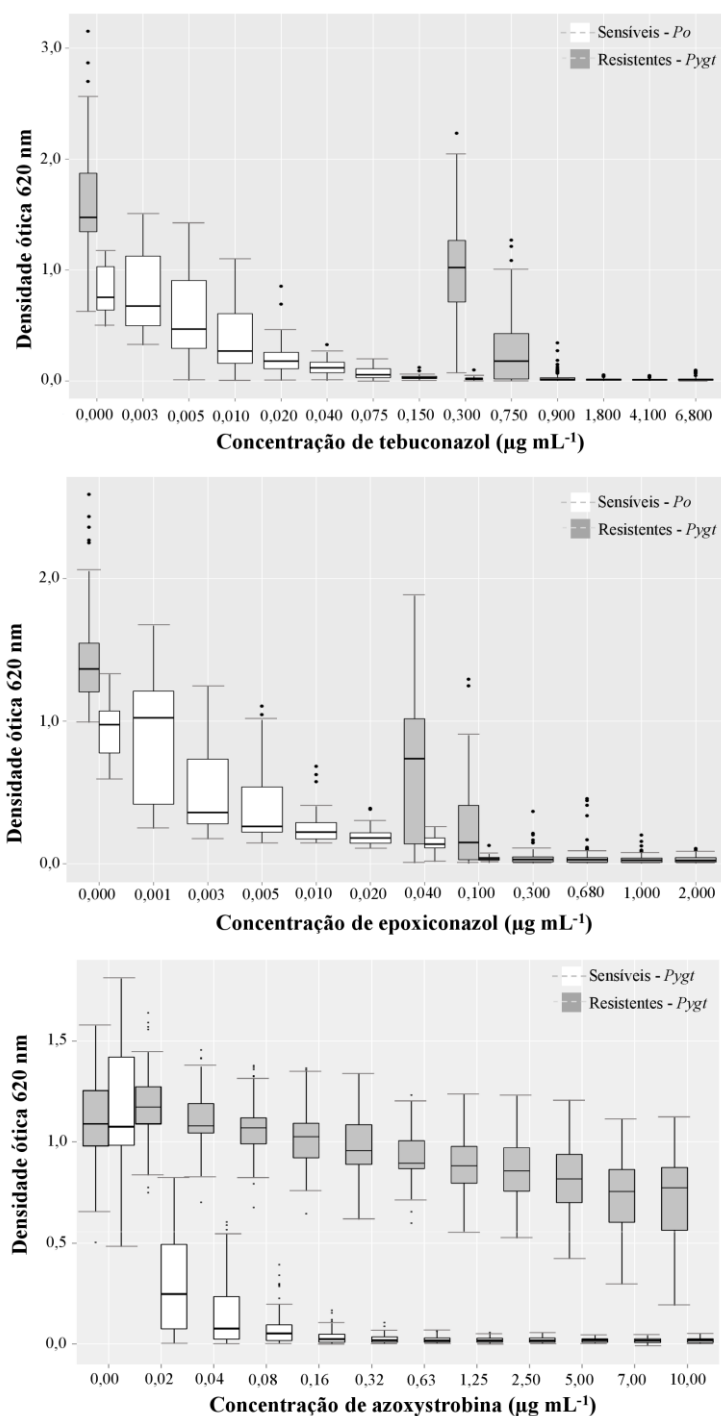


Figura 2. Curva dose-resposta do crescimento de *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt) e *P. oryzae* (Po) expresso em unidade de densidade ótica em função de doses dos fungicidas tebuconazol e epoxiconazol (DMI) e azoxistrobina (QoI). ^{a,b}

^a Para fungicidas DMI triazóis, média de $N = 13$ isolados resistentes de Pygt e $N = 4$ isolados sensíveis de Po.

^b Para fungicidas QoI estrobirulinas, média de $N = 5$ isolados resistentes e $N = 8$ isolados sensíveis de Pygt.

Sob o ponto de vista quantitativo, de forma geral para os três fungicidas testados, os valores de EC_{50} para o método de microplacas foram significativamente menores em comparação com o método de placas de Petri, dentro do grupo fenotípico resistente (Figura 3).

Em média, para o método de microplaca, a EC_{50} de isolados resistentes foi de $0,14 \pm 0,06 \mu\text{g ml}^{-1}$ de epoxiconazol, $0,61 \pm 0,19 \mu\text{g ml}^{-1}$ para isolados resistentes de tebuconazol e $7,06 \pm 8,08 \mu\text{g ml}^{-1}$ para isolados resistentes de azoxistrobina. Já para o método de placas de Petri, observou-se valores significativamente maiores de EC_{50} , como se segue: $1,22 \pm 0,14 \mu\text{g ml}^{-1}$ para isolados resistentes de epoxiconazol, $1,24 \pm 0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$ para isolados resistente de tebuconazol e $34,01 \pm 29,93 \mu\text{g ml}^{-1}$ para isolados resistente de azoxistrobina (Figura 3).

Por sua vez, não houve diferença significativa entre métodos dentro do grupo fenotípico sensível. Em média, para o método de microplaca, a EC_{50} de isolados sensíveis foi de $0,0074 \pm 0,0035 \mu\text{g ml}^{-1}$ de epoxiconazol, $0,014 \pm 0,0059 \mu\text{g ml}^{-1}$ de tebuconazol, e $1,47 \pm 2,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de azoxistrobina. Em comparação, para o método de placas de Petri, para isolados sensíveis observou-se EC_{50} de $0,034 \pm 0,0062 \mu\text{g ml}^{-1}$ de epoxiconazol, $0,034 \pm 0,0062 \mu\text{g ml}^{-1}$ de tebuconazol e $1,02 \pm 5,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ de azoxistrobina (Figura 3).

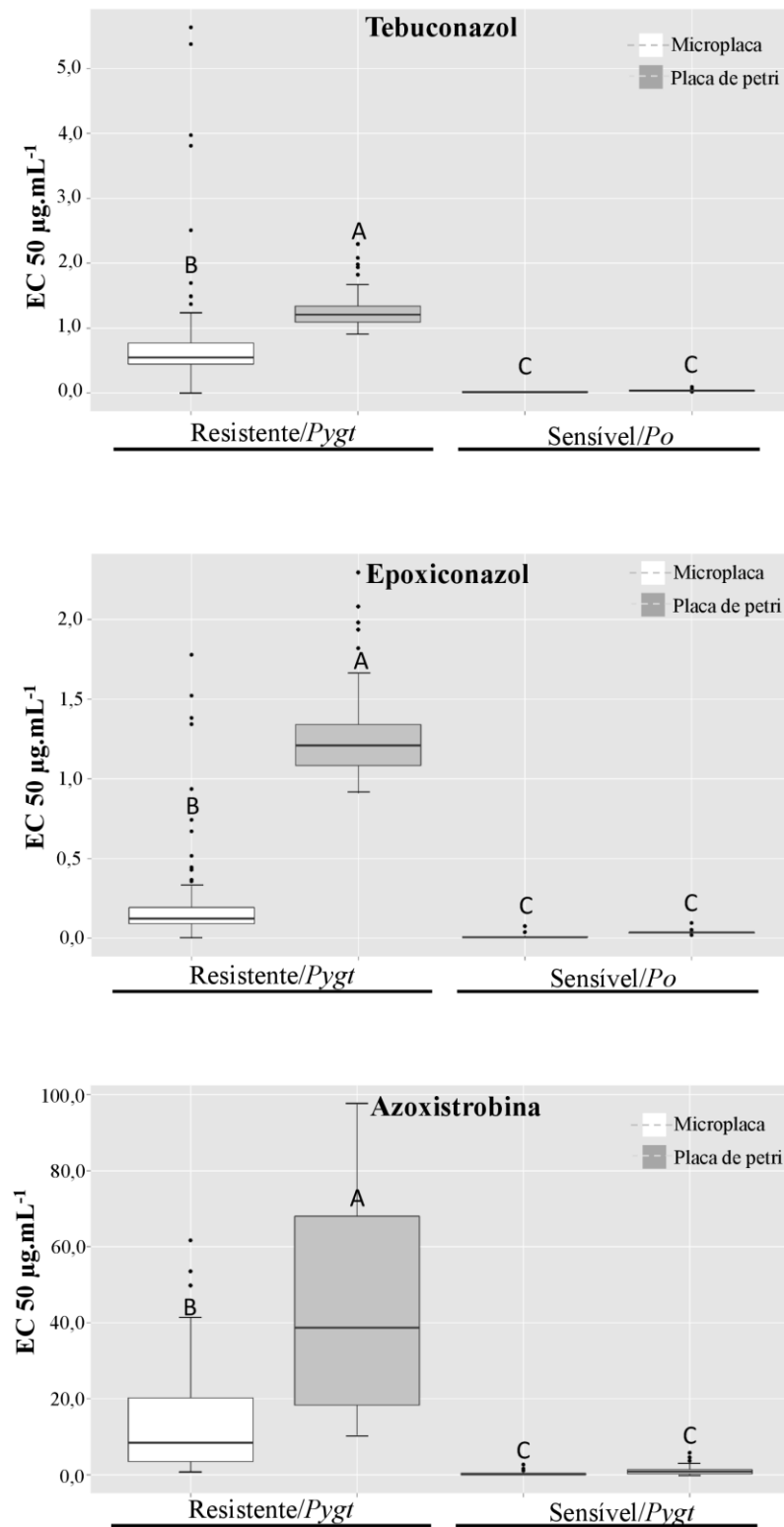


Figura 3. Boxplots representando a variação dos valores de EC₅₀ de grupos de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* e *Pyricularia oryzae* resistentes ou sensíveis aos fungicidas DMI triazóis (tebuconazol e epoxiconazol) ou QoI estrobirulinas (azoxistrobina) de acordo com método de microplacas (boxplot branco) e o método de placas de Petri (boxplot cinza). ^{a, b, c}

^a A linha horizontal dentro do *boxplot* representa os valores das medianas correspondentes ao número de isolados de cada categoria e 10 repetições por grupo de isolados.

^b Medianas para grupos de isolados obtidas com $N = 13$ isolados de *Pygt* resistentes e $N = 4$ isolados de *Po* sensíveis a triazóis.

^c Medianas para grupos de isolados obtidas com $N = 5$ isolados de *Pygt* resistentes e $N = 8$ isolados sensíveis a azoxistrobina.

^d Os *boxplots* com as mesmas letras indicam que as médias de métodos, dentro de grupo fenotípico, não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott para comparação de médias a $p < 0,05$].

Muito embora com valores de EC_{50} significativamente menores, o método da microplaca foi semelhantemente acurado e de precisão similar ou superior, permitindo discriminar os fenótipos de resistência dos de sensibilidade dos isolados de *Pygt* e/ou *Po* aos fungicidas tebuconazol, epoxiconazol e azoxistrobina (efeito significativo de grupos fenotípicos, Tabela 3), reproduzindo, também, as observações de estudos anteriores utilizando fenotipagem pelo método de placas de Petri (5, 6).

Quantitativamente, o uso do método de microplaca, também, detectou significativas entre isolados de *Pgyt* e/ou *Po* dentro de grupos fenotípicos resistentes e sensíveis aos fungicidas tebuconazol, epoxiconazol e azoxistrobina, assim como detectado anteriormente usando-se o método de placas de Petri (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) de valores de EC_{50} comparando-se o efeito dos métodos de microplacas e de placas de Petri, e de grupos de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* e de *P. oryzae* resistentes ou sensíveis aos fungicidas tebuconazol, epoxiconazol e azoxistrobina e as respectivas interações.

Fungicida	Fatores de variação	G.L.	Q.M.	F	$p > F$
Métodos					
Método da microplaca					
Tebuconazol	Grupos fenotípicos	1	7.244	616.456	$< 2 \cdot 10^{-16}***$
	Isolados (Grupo)	15	0.145	12.350	$8.3 \cdot 10^{-16}***$
	Bloco	9	0.091	0.858	0.565

Fungicida	Fatores de variação	G.L.	Q.M.	F	p > F
Epoxiconazol	Resíduo	88	0.012		
	Método de placas de Petri				
	Grupos fenotípicos	1	26.297	1473.626	< 2 10 ⁻¹⁶ ***
	Isolados (Grupo)	12	0.053	2.981	0.00211**
	Bloco	7	0.104	5.832	2.46 10 ⁻⁰⁵ ***
	Resíduo	69	0.018		
	Métodos				
	Método da microplaca				
	Grupos fenotípicos	1	0.4371	239.685	< 2 10 ⁻¹⁶ ***
	Isolados (Grupo)	15	0.0154	8.420	9.85 10 ⁻¹² ***
	Bloco	9	0.0050	2.744	0.00694**
	Resíduo	92	0.0018		
	Método de placas de Petri				
	Grupos fenotípicos	1	18.560	3957.786	< 2 10 ⁻¹⁶ ***
	Isolados (Grupo)	12	0.027	5.668	2.49 10 ⁻⁰⁶ ***
	Bloco	7	0.027	5.684	4.96 10 ⁻⁰⁶ ***
Azoxistrobina	Resíduo	58	0.005		
	Método	1			
	Método da microplaca				
	Grupos fenotípicos	1	2731.8	83.856	7.48 10 ⁻¹⁴ ***
	Isolados (Grupo)	11	41.6	0.461	0.255
	Bloco	9	15	1.276	0.896
	Resíduo	75	32.6		
	Método de placas de Petri				
	Grupos fenotípicos	1	41018	115.417	4.76 10 ⁻¹⁶ ***
	Isolados (Grupo)	11	325	0.914	0.532
	Bloco	7	403	1.133	0.354
	Resíduo	65	355		

Em função de não ter sido detectado interação significativa entre réplicas dos experimentos e demais fatores de variação, as réplicas dos dois experimentos foram combinadas.

** Significativa pelo teste F a $p \leq 0,01$

*** Significativa pelo teste F a $p \leq 0,001$

Foram consideradas o tempo para execução das técnicas de microplacas e de placas de Petri considerando a caracterização fenotípica de 30 isolados do patógeno, conforme fluxograma apresentado na Figura 4. O método de microplacas demandou 30 dias para completar um processo de fenotipagem de 30 isolados, enquanto o de placas de Petri demandou 23 dias. Os métodos possuem atividades diárias que não ultrapassam oito horas de trabalho, por exemplo o preparo de meio de cultura, a reativação de culturas fúngicas, a repicagem de culturas reativadas. A incubação de culturas para crescimento micelial ou para produção de esporos, que varia de 7 a 15 dias, não demanda horas efetivas de trabalho e, portanto, permite a sobreposição de outros processos paralelos de fenotipagem, otimizando recursos e mão-de-obra disponível.

O método de placas de Petri requisita um total de 52 h totais de trabalho despendidas em suas atividades, 14 h a mais que o requisitado para o método de microplacas, que totaliza 38 h. Pertinentemente, são necessárias mais horas para preparo de meio de cultura em placas de Petri, para o estabelecimento e avaliação do experimento (Figura 4). Quanto aos componentes que geraram consumo de energia, o método de placas de Petri requereu maior tempo para autoclavagem de material, maior tempo de uso da câmara de fluxo laminar para estabelecimento dos experimentos, além de quantidade consideravelmente maior de estufas incubadora (quatro, ao invés de uma) que resultou em consumo de energia elétrica equivalente a três vezes o consumo pelo método de microplacas (Tabela4).

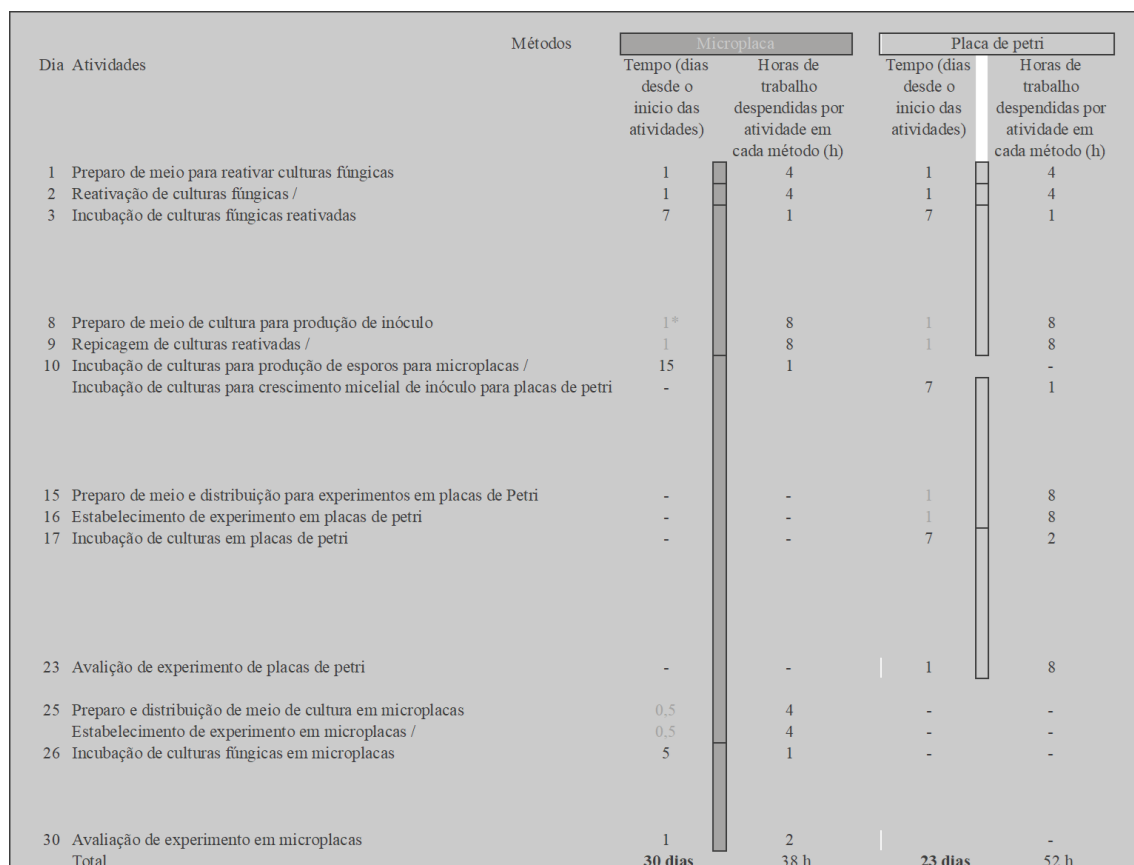


Figura 4. Cronograma comparativo de atividades para estabelecimento de experimentos de detecção de resistência à fungicidas *in vitro* pelos métodos de microplaca e placa de Petri, 2017.

^a As barras cinza e branca indicam duração das atividades consecutivas em cada método.

Foram comparados ainda os custos de investimentos requeridos pelos dois métodos de detecção de resistência a fungicidas, considerando que o laboratório dispõe de equipamentos básicos requeridos pelos dois métodos, tais como uma autoclave, uma câmara de fluxo laminar e estufas incubadoras (no mínimo uma), o investimento inicial para o sistema de microplacas foi de U\$ 6,208.49 (leitor de microplaca e micropipetas) enquanto que para o sistema de placas de Petri foi de U\$ 1,382.39 (micropipetas), considerando que o laboratório teria outras três incubadoras disponíveis. Não havendo disponibilidade, deve ser adicionado o custo de U\$ 4,575.47 para aquisição das incubadoras, totalizando U\$ 5,957.86. Dado ao alto valor de capital fixo para implantação de qualquer um dos dois métodos é necessário avaliar, de forma integral, as possibilidades e necessidades de cada laboratório ou grupo de pesquisa para inovar e implementar o uso destas técnicas de detecção de resistência a fungicidas.

Com relação à composição do custo operacional efetivo (COE), para o método de microplacas o gasto com mão de obra representou 70,99% dos custos de insumos (Tabela 4), seguido da energia elétrica, que representou 15,09% dos custos. Já para o método da placa de Petri o gasto com mão de obra representou 46,54% dos custos enquanto a energia elétrica representou 30,83%.

Tabela 4. Valores detalhados de custo discriminando gastos de energia e tempo aproximado dispendido em cada atividade para os métodos de microplaca e placa de Petri, 2017.

Ítem e detalhamento das atividades geradoras de consumo de energia	Microplacas			Placas de Petri		
	Potência kW ^a	Horas	Valor (\$)	Potência kW ^a	Horas	Valor (\$)
1.Energia consumida pelo uso da autoclave ^b	2,7	1	1.02	2,7	4	4.10
2.Energia consumida pelo uso da câmara de fluxo laminar ^c	0,4	4	0.6	0,4	10	1.52
3.Energia consumida pelo uso de incubadoras tipo BODs ^d	0,4	648	98.62	1,6	504	306.83
4.Tempo de avaliação de experimento em leitor de microplaca	0,06	0,25	0.003	-	8	-
Total	-		100,24	-		312,45

^a Para cálculo do valor final foi utilizado a tarifa de alta tensão disponível no site Elektro: www.elektro.com.br, no valor de (R\$ 1,21, equivalente a US\$0.38).

^b Utilizada para preparo de meios de cultura e esterilização de material; ^c Utilizada para distribuição de meio de cultura, repicagem de culturas, estabelecimento e avaliação de experimento; ^d Utilizada para incubação de culturas em microplacas (uma incubadora) ou em placas de Petri (quatro incubadoras); ^e Utilizada para avaliação de experimentos em microplacas.

Destaca-se que o custo operacional total (COT) para o método de microplaca apresentou um total de U\$739.04 o qual ainda é 33,05% inferior ao COT do método de placas de Petri (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativa de custos considerando o número de 30 isolados para os métodos de microplaca e placa de Petri para detecção de resistência a fungicidas em populações de fungos fitopatogênicos, 2017.

Descrição	Método de microplacas				Método de placas de Petri			
	Quantidade (Unidades ou gramas)	Valor Unit. (U\$)	Valor Total (U\$)	%	Quantidade (Unidades ou gramas)	Valor Unit. (U\$)	Valor Total (U\$)	%
Mão de Obra	1	471.69	471.69	70,99	1	471.69	471.69	46,54
Energia elétrica	-	-	100.24	15,09	-	-	312.45	30,83
Microplacas de cultura (96 poços)	5	1.41	7.07	1,06	0	0,00	0,00	-
Placas de Petri descartáveis 90x15mm	180	0.15	28.30	4,26	810	0.15	127.35	12,56
Ponteira de 20-200 µL, com filtro	60	0.07	4.52	0,68	12	0.07	0.90	0,09
Ponteira de 0.5-10 µL, com filtro	60	0.06	3.96	0,60	12	0.06	0.79	0,08
Tubos falcons (15 ml)	60	0.17	10.56	1,59	0	0,00	0,00	-
Botijão de gás	1	16.98	16.98	2,56	1	16.98	16.98	1,68
Caldo Batata dextrose (500g)	68,31g	78.30	10.69	1,60	232,87g	78.30	36.46	3,60
Agar (500g)	37,5g	139.10	10.43	1,57	168,75g	139.10	46.94	4,63
Custo Operacional Efetivo (COE)			664.44				1,013.56	
Outras Despesas (5% COE)			41.38				39.71	
Depreciação Linear			33.22				50.68	
Custo Operacional Total (COT)			739.04	100			1,103.95	100

Outras contribuições científicas na área de detecção de resistência de fitopatógenos a fungicidas, advogam favoravelmente pela utilização do método de microplacas para outros patossistemas. Segundo Vega *et al.* (9), o método de microplacas para análise da sensibilidade de *Alternaria alternata* de tangerinas à fungicidas QoI teve vantagens sobre o método convencional de placas de Petri, pois permitiu a avaliação de múltiplos isolados e concentrações de fungicidas ao mesmo tempo. Já Cox *et al.* (1) qualificaram e quantificaram a sensibilidade de *Monilinia fructicola* ao grupo de fungicidas triazóis usando o método de microplacas. Segundo os autores, o método pode ser considerado rápido, confiável (i.e., acurado e preciso) e de fácil reprodução quando comparado aos métodos tradicionais.

No geral, o método de microplacas para detecção de resistência a fungicidas demonstrou ser acurado e eficiente no uso de recurso, podendo ser recomendado para o monitoramento contínuo de variação fenotípica em novas populações do patógeno da brusone do trigo.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se com esse estudo que o método da microplaca, permitiu discriminar com acurácia e maior precisão os fenótipos de resistência e sensibilidade a triazóis e estrobirulinas em populações de isolados do patógeno da brusone do trigo.

O método de microplacas foi mais eficiente no uso de recursos, com custo operacional total 33,05 % inferior ao do método de placas de Petri.

Os fatores rapidez, acurácia e eficiência no uso de recursos indicam que o método de microplaca pode ser incorporado no desenvolvimento de um sistema de monitoramento de resistência a fungicidas em populações do fungo da brusone do trigo no agroecossistema brasileiro.

REFERÊNCIAS

- ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Medical Mycology**, Oxford, v. 45, p. 495-587, 2007.
- BAMPI, D. et al. Sensibilidade de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas. **Bioscience Journal**, Darmstadt, v. 29, n. 4, p. 787-795, 2013.
- BOTELHO, T. S. et al. Vancomycin microbial assay using Kinetic-Reading Microplate System. **Current Pharmaceutical Analysis**, Bussun, v. 9, n. 2, p. 172-176, 2013.
- BROEKAERT, W. F. et al. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology, West Sussex**, v. 69, p. 55-60, 1990.
- CASTROAGUDÍN, V. L. et al. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 105, n. 3, p. 284-294, 2015.
- COOLS, H. J. et al. Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, n. 7, p. 1034-1040, 2012.
- COOLS, H. J. et al. Heterologous expression of mutated eburicol 14 α -demethylase (CYP51) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 9, p. 2866-2872, 2010.
- COX, K. D. et al. A rapid method to quantify fungicide sensitivity in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, p. 328-331, 2009.
- DEISING, H. B. et al. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 286-295, 2008.
- ESTEP, L. K. et al. Emergence and early evolution of fungicide resistance in North American populations of *Zymoseptoria tritici*. **Plant Pathology**, West Sussex, v. 64, n. 4, p. 961-971, 2015.
- FORCELINI, C. A. et al **Resistência de fungos a fungicidas**. Passo Fundo: Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 2001.
- FRAAIJE, B. A. et al Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control *Septoria* leaf blotch in wheat. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 263-275, 2012.
- FRAAIJE, B. A. et al. A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 245-254, 2007.

- LEROUX, P. et al. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 63, n. 7, p. 688-698, 2007.
- LOURENÇO, F. R. et al. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 47, n. 3, 2011.
- LUCAS, J. A. et al. The evolution of fungicide resistance. **Advances in Applied Microbiology**, Maryland Heights, v. 90, p. 29-92, 2015.
- LUDWING, A. et al. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. **FEMS Microbiology**, West Sussex, v. 69, p. 61-66, 1990.
- MA, Z. et al Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (*cyp51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2581-2585, 2006.
- MACIEL, J. L. N. et al. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 1, p. 95-107, 2014.
- MATSUNAGA, M. et al. A. Metodologia de custo de rodução utilizada pela IE. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 123-139, 1976.
- OLIVEIRA, S. C. et al. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, p. 298-304, 2015.
- PANEK, J. et al. Comparison of chemical sensitivity of fresh and long-stored heat resistant *Neosartorya fischeri* environmentsl isolates using Biolog phenotype microarray system. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0147605, 2016.
- PINTO, T. J. A. et al. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. **Atheneu**, v. 3 ed, p. 261-287, 2010.
- POLONI, N. M. **Distribuição pervasiva da resistência a fungicidas triazóis e evolução do gene cyp51A em populações de *Pyricularia oryzae* da brusone do trigo no Brasil** 2016. 39 Mestrado - Departamento de Fitossanidade, Engenharia rural e solos - UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
- R_Core_Team. **R: a language and environment for statistical computing**. R foundation for statistical computing. 2013.
- REKANOVIC, E. et al. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thlophanate-methyl. **Pesticides Phytomedicine**, Belgrade, v. 25, p. 325-333, 2010.
- VAN DEN BOSCH, F. et al. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 175-195, 2014.

VARGAS, M. H. **ED50plus v1.0**. México: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 2000.

VEGA, B. et al. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate QoI sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1262-1270, 2012.

Capítulo 2. Evidência de resistência ao fungicida fluxapiroxade, um inibidor de succinato desidrogenase (SDHI), em populações de *Pyricularia graminis-tritici* da brusone do trigo no Brasil

RESUMO

Os fungicidas (SDHIs) da primeira geração foram lançados na década de 60 para o controle de fungos basidiomicetos e compreendem o grupo das carboxinas e oxicarboxinas. Recentemente, foram lançados os fungicidas SDHIs da segunda geração que incluem diferentes princípios ativos como boscalid, fluxapiroxade, pentiopirade, isopirasame, fluopirame, bixafen e sedaxane os quais ampliaram o espectro de controle de doenças, inclusive contra doenças dos cereais causadas por fungos ascomicetos. O alvo de ação dos SDHIs é o complexo succinato desidrogenase (SDH) presente na cadeia respiratória mitocondrial, também referido como complexo II ou succinato:ubiquinona oxiredutase (SQR). O complexo II é composto por quatro subunidades denominadas de SDHA, SDHB, SDHC e SDHD. Estudos relacionados a resistência aos SDHIs revelaram, principalmente, mutações em sítios únicos (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) encontrados em genes do complexo SDH para diversos fitopatógenos. Apesar do lançamento recente desses novos princípios ativos, já há relatos de fitopatógenos resistentes em campos no Brasil. Como modelo de estudo escolheu-se o patógeno da brusone do trigo no Brasil, para o qual há evidência de resistência a estrobirulina e a triazóis. Para se estabelecer o *baseline* de populações de *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt) do trigo ao fungicida fluxapiroxade, inicialmente foi determinada, com base na EC₅₀ (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial fúngico), a distribuição de frequência de padrões de sensibilidade de populações do patógeno. Fenótipos extremos de sensibilidade e resistência a fluxapiroxade foram detectados nas diferentes populações do patógeno. Considerando que os fungicidas da segunda geração de SDHI são de alto risco para desenvolvimento de resistência em populações de fitopatógenos, é necessária a avaliação do registro e recomendação de uso contínuo do fluxapiroxade, como único princípio ativo numa formulação para o manejo da brusone e de outras doenças do trigo no Brasil. Como estratégia anti-emergência para evitar resistência a SDHI, esse fungicida só poderia ser registrado em co-formulações com outro princípio ativo de baixo risco para resistência.

Palavras-chave: Resistência a fungicidas. Mutação. Seleção natural. Fitopatógenos do trigo.

ABSTRACT

Evidence of resistance to fungicide, fluxapiroxade, a succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI), in populations of *Pyricularia graminis-tritici* of wheat blast in Brazil

The first generation fungicides (SDHIs) were launched in the 1960s for the control of basidiomycete fungi and comprise the group of carboxins and oxycarboxines. Recently, second-generation SDHI fungicides have been introduced which include different active principles such as boscalid, fluxapiroxade, pentiopride, isopirasame, fluopirame, bixafen and sedaxane which have broadened the spectrum of disease control, including against cereal diseases caused by ascomycetic fungi. The SDHIs action target is the complex succinate dehydrogenase (SDH) present in the mitochondrial respiratory chain, also referred to as complex II or succinate: ubiquinone oxiredutase (SQR). Complex II is composed of four subunits called SDHA, SDHB, SDHC and SDHD. Studies related to resistance to SDHIs revealed, mainly, single nucleotide polymorphisms (SNPs) found in SDH complex genes for several phytopathogens. Despite the recent launch of these new active principles, there are already reports of resistant plant pathogens in fields in Brazil. As a study model the wheat blast pathogen in Brazil was chosen, for which there is evidence of resistance to strobirulin and triazoles. To establish the baseline of *Pyricularia graminis-tritici* (*Pygt*) populations of wheat to the fungicide fluxapiroxade, it was initially determined, based on EC₅₀ (concentration sufficient to inhibit 50% mycelial fungal growth), the frequency distribution of sensitivity patterns of pathogen populations. Extreme phenotypes of sensitivity and resistance to fluxapiroxade were detected in the different pathogen populations. Whereas the second generation of SDHI fungicides are at high risk for development of resistance in populations of plant pathogens, it is necessary to review the labeling and recommendation of continuous application of fluxapyroxad, as the sole active ingredient in any formulation for chemical management of wheat blast and other wheat diseases in Brazil. As an anti-emergence strategy to avoid the resistance to SDHI, this fungicide could only be labeled in co-formulations with another active ingredient of low risk for resistance.

Keywords: Resistance to fungicides. Mutation. Natural selection. Plant pathogens on wheat.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Pyricularia graminis-tritici* é o agente causal da brusone do trigo, relatada como uma das principais doenças fúngicas que afetam a cultura do trigo (GOULART et al., 2007). A brusone pode causar redução de até 70% do rendimento dos grãos associado ao branqueamento e chochamento das espigas (GOULART et al., 2007).

No manejo integrado da brusone, o principal componente utilizado são os fungicidas aplicados na parte aérea (GOULART et al., 2007). Ainda que estudos recentes sugerem que algumas variedades de trigo cultivadas no Brasil possuem resistência à brusone no estágio de espigamento, nenhuma das variedades testadas exibiu resistência a todos aos grupos de virulência de *P. graminis-tritici*. Por isso, o uso de fungicidas acaba se tornando indispensável (MACIEL et al., 2014; PAGANI et al., 2014).

Os inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) são os fungicidas mais modernos, recém registrados, para manejo de doenças do trigo no Brasil, incluindo a brusone (MAPA, 2017). Os fungicidas SDHI podem ser divididos em duas gerações. As moléculas da geração I, que compreendem a carboxina e oxicarboxina, foram usados desde a década de 60 contra fungos basidiomicetos, porém possuíam atividade limitada contra outros patógenos. Já a nova geração, denominada SDHIs geração II, que incluem: boscalid (BASF), fluxapiroxade, pentiopirade (Mitsui Chemicals), isopirasame (Syngenta), fluopirame (Bayer), bixafen (Bayer) e Sedaxane (Syngenta) possuem amplo espectro de atividade fúngica contra doenças de cereais que incluem fungos ascomicetos fitopatogênicos (AVENOT & MICHAILIDES, 2010; SCALLIET et al., 2012).

O alvo de ação dos fungicidas SDHIs é o complexo succinato desidrogenase (SDH) presente na cadeia respiratória mitocondrial, também referido como complexo II ou succinato:ubiquinona oxiredutase (SQR) (AVENOT & MICHAILIDES, 2010). As moléculas SDHIs ligam-se especificamente ao sítio da ubiquinona (*Q-site*) do complexo II mitocondrial e inibem a respiração do fungo (MIYAMOTO et al., 2010). O complexo II é composto por duas subunidades hidrofílicas periféricas (SDHA e SDHB) e duas subunidades integradas à membrana interna mitocondrial (hidrofóbicas) denominadas de SDHC ou CybL e SDHD ou CybS, sendo que as duas últimas formam a subunidade maior e menor do citocromo b, respectivamente (OMURA ; SHIOMI, 2007). Estudos relacionados à resistência aos SDHIs revelaram a ocorrência, principalmente, de mutações em sítios únicos (SNP - *single nucleotide polymorphism*) encontrados em genes do complexo SDH para diversos

fitopatógenos [para uma excelente revisão e descrição das mutações conhecidas por conferir resistência a fungicidas SDHI ver Avenot e Michailides (2010)].

De acordo com o FRAG (*Fungicide Resistance Action Group*), os fungicidas SDHI geração II são considerados altamente efetivos no controle de doenças do trigo e cevada. Entretanto, o FRAG considera essa classe de fungicidas com risco médio/alto evolutivo para o desenvolvimento de resistência em fitopatógenos associados a doenças em cereais, principalmente porque o alvo de ação de toda essa classe de fungicidas é basicamente o mesmo.

Apesar da utilização de fungicidas SDHI geração II ser recente na agricultura, já foram detectados casos de fitopatógenos resistentes à essa classe de fungicidas pouco tempo após sua adoção em programas de manejo químico de doenças. Foram relatados casos de resistência a SDHI em populações do patógeno da mancha de *Alternaria* em pistache, *Botrytis* em maçã e morango e mancha foliar de *Corynespora* em pepino (FRAG, 2014) e para *Alternaria solani* em batata (GUDMESTAD ; ARABIAT, 2013). Outros artigos relataram sensibilidade reduzida (acima do *baseline*) aos SDHIs em isolados de *Pyrenophora teres* na Alemanha (FRAG, 2014) e de mancha de *Septoria* (*Mycosphaerella graminicola*) em trigo na França e no Reino Unido (SCALLIET et al., 2012).

No Brasil, uma nota técnica da Comissão Brasileira de Trigo e Triticale alerta para a forte pressão de seleção que poderá ocorrer com o uso continuado de fungicidas SDHI para o controle de ferrugens do trigo, e apontam para o risco de resistência com perspectiva de se perder esse novo grupo de fungicidas rapidamente (COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 2011). Entretanto, até então não há qualquer relato sobre a ocorrência de resistência a fungicidas SDHI em patógenos de cereais.

Em trigo, recentemente foi relatado a ocorrência generalizada de resistência ao fungicida azoxistrobina do grupo dos IQos (inibidores da quinona oxidase) em populações de *P. graminis-tritici* no centro-sul do Brasil (CASTROAGUDIN et al., 2015). Essas mesmas populações apresentaram elevados níveis de resistência aos fungicidas triazóis epoxiconazole e tebuconazole, da classe dos DMIs (inibidores da demetilação de esteróis) (POLONI et al., 2016), apontando para dupla resistência a duas classes distintas de fungicidas sistêmicos, largamente usadas na cultura do trigo.

A pesquisa teve como objetivo determinar o *baseline* de populações de *P. graminis-tritici* do trigo, com base na EC₅₀ (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial fúngico), descrevendo a distribuição de frequência da sensibilidade de populações do

patógeno ao fungicida SDHI fluxapiroxade. Fenótipos extremos de sensibilidade e resistência a fluxapiroxade foram detectados nas diferentes populações do patógeno.

2. HIPÓTESES

Determinar o padrão de sensibilidade (*baseline*) de populações de *Pygt* associadas ao trigo ao fungicida fluxapiroxade, da classe dos SDHI (inibidores da succinato desidrogenase).

Caracterizar as distribuições de frequências de sensibilidade / resistência de populações de *Pygt* ao fungicida SDHI fluxapiroxade, baseando na EC₅₀ dos isolados.

Em contraposição à hipótese inicial testada de que não seriam encontrados isolados de *Pygt* resistentes ao fungicida fluxapiroxade do grupo dos SDHIs, aceitou-se a hipótese alternativa de elevada frequência de isolados com sensibilidade reduzida e da ocorrência, mesmo que em baixa frequência, de isolados moderadamente resistentes e resistentes ao fungicida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Seis populações de isolados de *P. graminis-tritici* da brusone do trigo e uma de *P. oryzae* do arroz (como padrão de sensibilidade) foram avaliadas quanto ao padrão de sensibilidade (*baseline*) e à distribuição de frequência da sensibilidade / resistência ao fungicida SDHI fluxapiroxade *in vitro*, com base na EC₅₀ dos isolados ao fungicida. Os isolados de *Pygt* foram obtidos de espigas infectadas em áreas de trigo amostradas em 2012 e 2013. Os isolados de *P. oryzae* foram cedidos pela EMBRAPA Arroz e Feijão (Tabela 1). Todos os isolados selecionados representam distintos genótipos multiloci microssatélites distintos (MACIEL et al., 2014; PEREIRA et al., 2014).

Para fenotipagem da sensibilidade / resistência dos isolados de *Pygt* do trigo e de *Po* do arroz ao fungicida fluxapiroxade, foi adotado o método de microplacas, utilizando-se equipamento do tipo leitor de microplaca (MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo ScientificTM, EUA), de forma semelhante ao descrito por Fraaije *et al.* (2) para medida do crescimento fúngico, porém com modificações.

Tabela 1- Descrição de populações de *P. graminis-tritici* de áreas de trigo e de *P. oryzae* da brusone do arroz selecionadas para o estudo da variação fenotípica e genética para sensibilidade/resistência ao fungicida SDHI fluxapirroxade.

Anos de Coleta	População	Número de isolados selecionados	Variedades de trigo / Arroz	Local
<i>P. graminis-tritici</i> (Pygt)				
2012	DF + GO	22	BRS 254; BR 18	Brasília, DF; Rio Verde, GO
e 2013	MG	26	BRS 264 e BR 18	Patrocínio e Perdizes, MG
	MS	39	BRS Guaramirin	Amambal e Aral Moreira, MS
	PR	33	CD 104	Londrina, PR
	RS	18	-	Passo Fundo, São Luiz Gonzaga, São Borja e Três de Mato, RS
	SP	22	CD 116	Itaí, SP
<i>P. oryzae</i> (Po)				
2007	TO	10	Epagre 109, Epagre 114, Piracema, Best 2000	Formoso
Total		170		

Fonte: Elaborado pelo autor

Os isolados de *P. graminis-tritici* e de *P. oryzae* foram reativados em meio BDA (20,7g L⁻¹ de batata dextrose, 15g L⁻¹ ágar), com adição de cloranfenicol e estreptomicina (50 µg mL⁻¹ de cada). Após sete dias da reativação das culturas, transferiu-se discos de micélio para placas contendo meio BDA e incubou-se por quinze dias a 24°C e 12 h de fotoperíodo. Para a coleta dos esporos foi realizada a raspagem superficial do micélio com o auxílio de uma espátula esterilizada na presença de água destilada esterilizada acrescida do espalhante adesivo Tween 80 (2 gotas L⁻¹). A concentração da suspensão de esporos foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, ajustando-se para 2 x 10⁴ esporos mL⁻¹. A suspensão de esporos foi mantida por dezoito horas em câmara de crescimento a 24°C e 12 h de fotoperíodo para a pré-germinação dos esporos. O experimento consistiu na análise de 160 isolados de *Pygt* e 10 de *Po*, hierarquizados por população, como descrito na Tabela 1.

Na determinação da EC_{50} ao fungicida SDHI fluxapiroxade, foram utilizadas seis doses crescentes do fungicida, variando de 0 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As doses de fungicidas utilizadas foram pré-determinadas em experimento piloto. O volume total dispensado em cada poço da microplaca foi de 130 μL , distribuídos como segue: controle positivo (120 μL de caldo BD sem adição do fungicida + 10 μL da suspensão de esporos), branco ou controle negativo (130 μL de caldo BD com adição das distintas doses de fungicidas) e as demais amostras (120 μL de caldo BD com adição das diferentes doses de fungicida + 10 μL da suspensão de esporos do fungo). Ao caldo BD foi acrescido 0,5 mM de ácido salicil-hidroxâmico (SHAM), fundamental para suprimir a via alternativa da oxidase acompanhando os procedimentos relatados por Ma et al., (2006).

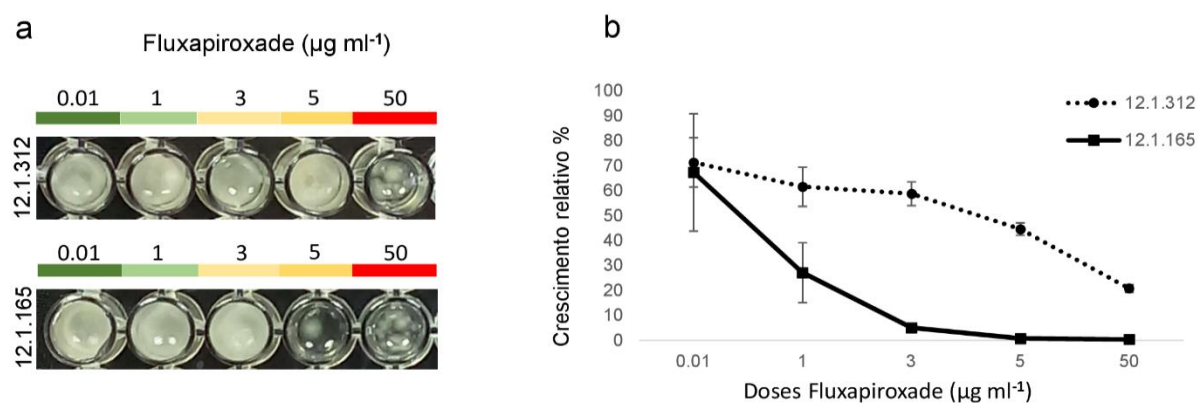
O crescimento relativo dos isolados foi determinado com base na leitura de absorbância de luz medida à 620 nm no leitor de microplacas descrito acima, às 120 horas após o início do experimento. Os valores obtidos foram utilizados para cálculo da EC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento do micélio) de cada isolado, utilizando o programa ED50plus v1.0 (VARGAS, 2000). Os experimentos consistiram de blocos casualizados, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi repetido uma vez. A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5% de probabilidade, foram efetuados no ambiente R com o uso do pacote estatístico Agricolae (R_CORE_TEAM, 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variação na sensibilidade de populações de *P. graminis-tritici* e *P. oryzae* de trigo ao fungicida fluxapiroxade

O aumento das doses do fungicida fluxapiroxade resultou em redução no crescimento micelial do fungo (Figura 1). Foi detectado diferença significativa, quanto à EC_{50} , entre populações do patógeno e para os isolados dentro de populações (Tabela 2), demonstrando que há variação fenotípica para sensibilidade a fluxapiroxade em populações de *Pygt* da brusone do trigo e de *Po* da brusone do arroz (escolhida como suposto padrão sensível).

Figura 1- Variação da sensibilidade *in vitro* de isolados antagônico de *Pyricularia graminis-tritici* em meio BD com doses crescentes do fungicida fluxapiroxade (a). Crescimento relativo de isolados que apresentaram maior e menor EC₅₀ em resposta ao aumento das concentrações de fluxapiroxade (b).



Fonte: Elaborado pelo autor

As diferenças significativas na sensibilidade de isolados ao fungicida fluxapiroxade, podem ser ilustradas comparando-se o crescimento de dois isolados contrastantes, em termos de fenótipo. Por exemplo, os isolados 12.1.165 (menos sensível) e o 12.1.312 (mais sensível), apresentaram crescimento relativo contrastante, variando de 20,8% a 0,4% na maior dose 50 µg ml⁻¹ de fluxapiroxade.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) baseada em valores de EC₅₀ de 170 isolados amostrados em 7 populações de *Pyricularia graminis-tritici* e *Pyricularia oryzae* de trigo para o fungicida fluxapiroxade.

Fungicida	F. V.	G.L	QM	F	p > F
Fluxapiroxade	Rep	9	185.4	5.126	7.33 10 ⁻⁷ ***
	Pop	5	1334.5	36.894	< 2 10 ⁻¹⁶ ***
	Pop:Isol	161	113.2	3.128	< 2 10 ⁻¹⁶ ***
Resíduo		1474	36.2		

Em função de não ter sido detectado interação significativa entre réplicas dos experimentos e demais fatores de variação, as réplicas dos dois experimentos foram combinadas.

*** Significativa pelo teste *F* a $p \leq 0,001$

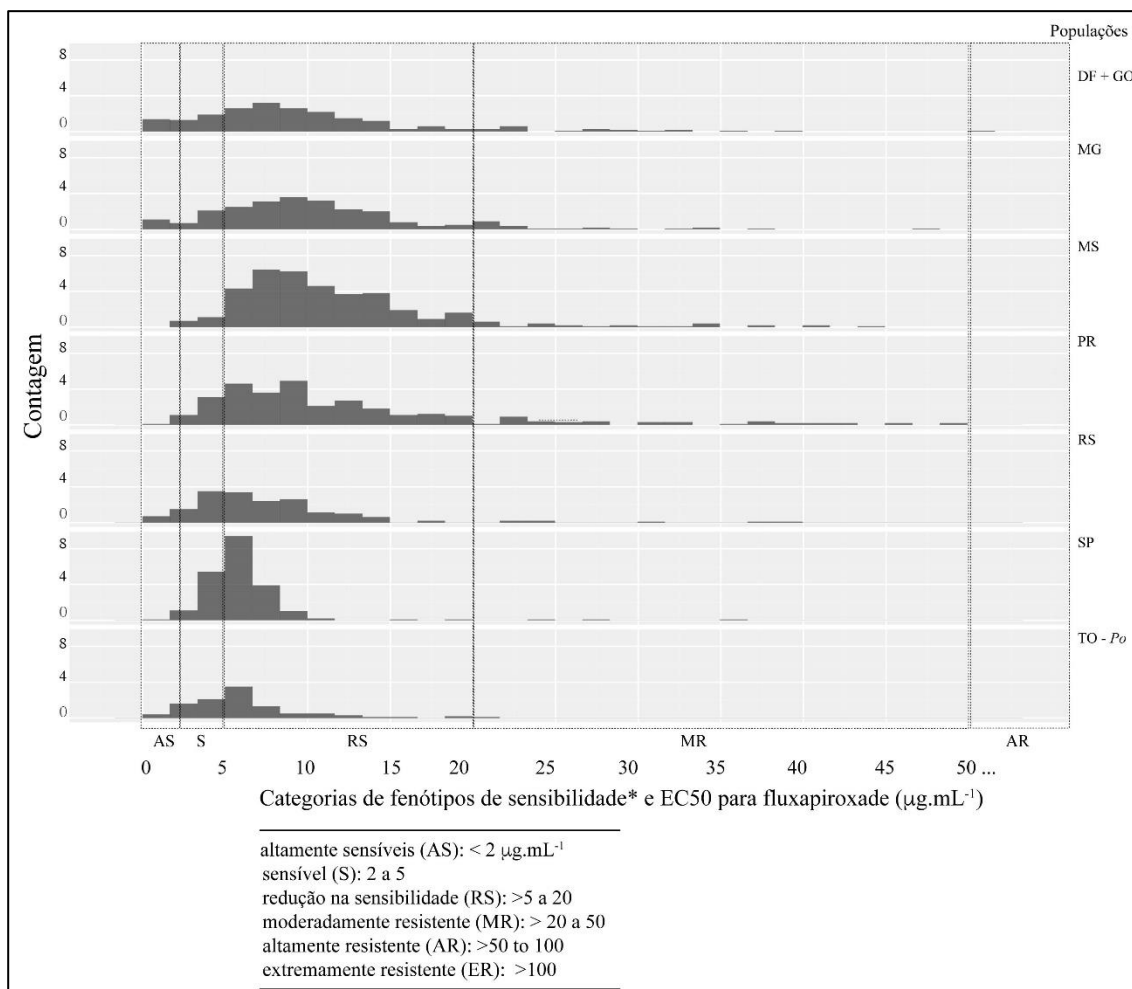
Analisando-se a distribuição de frequência da variação dos níveis fenotípicos de sensibilidade a fluxapiroxade de todas as populações do patógeno, e usando como modelo as categorias de fenotípicas estabelecidas por Amiri et al. para *Botritis cinerea* (2013), observou-se que a maioria dos isolados de *Pygt* apresentou indícios de redução na sensibilidade ao fungicida SDHI fluxapiroxade (Figura 2). Nesta categoria fenotípica foram incluídos, também, os isolados de *Po* da brusone do arroz.

Em todas as populações do patógeno da brusone do trigo foi detectada a ocorrência de isolados moderadamente resistentes, enquanto a população do DF+GO apresentou um isolado altamente resistente. Isso é inédito no país, uma vez que as populações do patógeno da brusone do trigo no centro-sul do Brasil, aparentemente ainda não haviam sido expostas à pressão de seleção por fungicidas de segunda geração SDHI.

Por outro lado, como é evidente, mesmo à baixa frequência, a ocorrência de resistência em todas as populações do patógeno, o cenário de desenvolvimento de resistência ao fungicida SDHI de segunda geração fluxapiroxade parece bastante plausível

Considerando que os fungicidas da segunda geração de SDHI são de alto risco para desenvolvimento de resistência em populações de fipatógenos, é necessária a avaliação do registro e recomendação de uso contínuo do fluxapiroxade, como único princípio ativo numa formulação para o manejo da brusone e de outras doenças do trigo no Brasil.

Figura 2 - Distribuição de frequência do nível de sensibilidade ao fungicida SDHI fluxapirroxade expresso pela EC_{50} apresentada por isolados de *Pyricularia graminis-tritici* amostrados de campos nos estados de DF_GO, MG, MS, PR, RS e SP. A população de uma espécie irmã *P. oryzae* da brusone do arroz amostrada de TO foi incluída como referência de sensibilidade. *Áreas demarcadas por barras tracejadas indicam categorias de fenótipo de sensibilidade (AMIRI et al., 2013).



Fonte: Elaborado pelo autor

Para estas mesmas populações do patógeno da brusone do trigo detectou-se distribuição generalizada da resistência a azoxistrobina, resistência cruzada a piraclostrobina, (CASTROAGUDIN et al., 2015, OLIVEIRA et al., 2015) e evidência de resistência a tebuconazol e epoxiconazol (POLONI et al., 2016). A detecção de resistência ao fungicida SDHI fluxapirroxade em populações de *Pygt* aponta para a ocorrência inédita no agroecossistema brasileiro de resistência tripla a fungicidas de alto risco de classes químicas distintas.

5. CONCLUSÕES

Em todas as populações estudadas, a maioria dos isolados de *P. graminis-tritici* e inclusive de *P. oryzae* (escolhida como suposto padrão sensível) apresentaram padrão de reduzida sensibilidade ao fungicida SDHI fluxapiroxade.

6. AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada, em parte, por auxílio à pesquisa concedido pela FAPESP ao orientador (Processo 2015/10453-8) e por bolsa de mestrado concedida pela CAPES à aluna.

7. REFERÊNCIAS

- AMIRI, A. et al. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 4, p. 532-539, 2013.
- AMIRI, A. et al. Resistance to respiration inhibitor fungicides in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 6, p. S3-S3. 3340.
- ANGELINI, R. M. et al. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 128, n. 2, p. 185-199, 2010.
- ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Medical Mycology**, Oxford, v. 45, p. 495-587, 2007.
- AVENOT, H. F. et al. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution on resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, p. 643-651, 2010.
- AVENOT, H. F. et al. Molecular characterization of boscalid-and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, n. 4, p. 645-651, 2012.
- BAMPI, D. et al. Sensibilidade de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas. **Bioscience Journal**, Darmstadt, v. 29, n. 4, p. 787-795, 2013.
- BOTELHO, T. S. et al. Vancomycin microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Current Pharmaceutical Analysis**, Bussum, v. 9, n. 2, p. 172-176, 2013.

BRENT, K. J. Historical perspectives of fungicide resistance. In: THIND, T. S. (Ed.). Fungicide resistance in crop protection: **Risk and management**, Wallingford, UK: CABI, p.3-18, 2012.

BRENT, K. J. et al. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. 2. Brussels, Belgium: Croplife International, 2007.

BROEKAERT, W. F. et al. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology**, West Sussex, v. 69, p. 55-60, 1990.

BRUNNER, P. C. et al. Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. **Molecular Plant Pathology**, West Sussex, v. 9, n. 3, p. 305-316, 2008.

CASTROAGUDIN, V. L. et al. Resistance to QoI fungicides Is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 105, n. 3, p. 284-94, 2015.

CASTROAGUDÍN, V. L. et al. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 105, n. 3, p. 284-294, 2014.

CLEMENT, M. et al. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, West Sussex, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000.

COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. **Informações técnicas para trigo e triticale-safra 2012**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 218 p.

COOLS, H. J. et al. Heterologous expression of mutated eburicol 14 α -demethylase (CYP51) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 76, n. 9, p. 2866-72, 2010.

COOLS, H. J. et al. Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. **Pest Management Science**, London, v. 68, n. 7, p. 1034-1040, 2012.

COX, K. D. et al. A rapid method to quantify fungicide sensitivity in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, p. 328-331, 2009.

DEISING, H. B. et al. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 286-295, 2008.

DEISING, H. B. et al. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 286-295, 2008.

ESTEP, L. K. et al. Emergence and early evolution of fungicide resistance in North American populations of *Zymoseptoria tritici*. **Plant Pathology**, West Sussex, v. 64, n. 4, p. 961-971, 2015.

FORCELINI, C. A. et al. **Resistência de fungos a fungicidas**. Passo Fundo: Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 2001.

FRAAIJE, B. A. et al. A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. **Molecular Plant Pathology**, West Sussex, v. 8, n. 3, p. 245-54, 2007.

FRAAIJE, B. A. et al. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control *Septoria* leaf blotch in wheat. **Molecular Plant Pathology**, West Sussex, v. 13, n. 3, p. 263-275, 2012.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION GROUP. **FRAG-UK statement on SDHI fungicides and resistance risk in cereals** - April 2014. Disponível em: <<http://www.pesticides.gov.uk/Resources/CRD/Migrated-Resources/Documents/F/frag-sdhi-statement-cereals-april-2014.pdf>,2014> Acesso em: 02 jul. 2015.

GOULART, A. C. P. et al. Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*T. aestivum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, p. 167-173, 1993.

GOULART, A. C. P. et al. Damages in wheat caused by infection of *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 358-363, 2007.

GRIMMER, M. K. et al. Evaluation of a matrix to calculate fungicide resistance risk. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 6, p. 1008-1016, 2014.

GUDMESTAD, N. C. et al. Prevalence and impact of SDHI fungicide resistance in *Alternaria solani*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 97, p. 952-960, 2013.

GUDMESTAD et al. Prevalence and Impact of SDHI Fungicide Resistance in *Alternaria solani*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 97, p. 952-960, 2013.

KEON, J. P. R. et al. Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. **Current Genetics**, Heidelberg, v. 19, n. 6, p. 475-481, 1991.

KIM, Y.S. et al. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 7, p. 891-900, 2003.

LEROUX, P. et al. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 63, n. 7, p. 688-698, 2007.

LOURENÇO, F. R. et al. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, 2011.

LUCAS, J. A. Avoiding and managing fungicide resistance. In: PROCEEDINGS OF THE HGCA R&D CONFERENCE HELD AT THE BELTON WOODS HOTEL, Lincolnshire, UK. 2006. **Proceedings of the...** Lincolnshire: [S.n.], 2006.

- LUCAS, J. A. et al. The evolution of fungicide resistance. In: SARIASLANI, S.; GADD, G. M. (Ed.). **Advances in applied microbiology**: London: Academic Press, 2015. p.29-92.
- LUDWING, A. et al. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. **FEMS Microbiology**, West Sussex, v. 69, p. 61-66, 1990.
- MA, Z. et al. Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (cyp51) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2581-2585, 2006.
- MACIEL, J. L. et al. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, p. 95-107, 2014.
- MIYADERA, H. S.; et al. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). **Proceedings of the National Academy of Science of the United States America**, v. 100, p. 473-477, 2003.
- MIYAMOTO, T. et al. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassicola* isolates resistant to boscalid. **Plant Pathology**, West Sussex, v. 59, p. 873-881, 2010.
- NEWCOMBE, G. et al. Inheritance of carboxin resistance in a European field isolate of *Ustilago nuda*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 2, p. 179-182, 2000.
- OLIVEIRA, S. C. et al. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, p. 298-304, 2015.
- OMURA, S. et al. Discovery, chemistry, and chemical biology of microbial products. **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v. 79, p. 581-591, 2007.
- PAGANI, A. P. et al. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 42, n. 5, p. 609-617, 2014.
- PANEK, J. et al. Comparison of chemical sensitivity of fresh and long-stored heat resistant *Neosartorya fischeri* environmentsl isolates using Biolog phenotype microarray system. **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0147605, 2016.
- PEREIRA, J. F. et al. Development of genomic SSR markers and molecular characterization of *Magnaporthe oryzae* Isolates from wheat in Brazil. **Biochemical Genetics**, New York, v. 52, p. 52-70, 2014.
- PINTO, T. J. A. et al. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p.261-287, 2010.
- POLONI, N. M. **Distribuição pervasiva da resistência a fungicidas triazóis e evolução do gene cyp51A em populações de *Pyricularia oryzae* da brusone do trigo no Brasil**. 2016. 39

f. Dissertação - (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2016.

PRABHU, A. S. et al. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectiva**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p.

PRABHU, A. S. et al. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

R_CORE_TEAM. R: **a language and environment for statistical computing**. R foundation for statistical computing. 2013.

REIS, E. M. et al. Controle cultural. In: BERGAMIN FILHO A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 761-785.

REKANOVIC, E. et al. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiofanate-methyl. **Pesticides Phytomedicine**, Belgrade, v. 25, p. 325-333, 2010.

SCALLIET, G. et al. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, p. e35429, 2012.

SIEROTZKI, H. et al. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. tritici field isolates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 68, n. 2, p. 107-112, 2000.

STAMMLER, G. Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity. In: SYMPOSIUM OF RESEARCH COMMITTEE ON FUNGICIDE RESISTANCE, 8, 2008, At Matsueshi. **Proceedings of the...** At Matsueshi: [S.n.], 2008. p. 30-43.

TALAS, F. et al. A. Significant variation in sensitivity to a DMI fungicide in field populations of *Fusarium graminearum*. **Plant Pathology**, West Sussex, v. 64, n. 3, p. 664-670, 2015.

THIND, T. S. **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. Wallingford, UK: CABI, 2012. 284 p.

VAN DEN BOSCH, F. et al. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 175-195, 2014.

VARGAS, M. H. **ED50plus v1.0**. México: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/drug/hcic50.htm>>. Acesso em: Janeiro de 2017.

VEGA, B. et al. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate QoI sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1262-1270, 2012.

VELOUKAS, T. et al. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, n. 10, p. 1302-1307, 2011.

WEBSTER, R. K. et al. **Compendium of rice diseases**. Minnesota: APS Press, 1992.

YANG, J. et al. Expression and homology modelling of sterol 14 α -demethylase of *Magnaporthe grisea* and its interaction with azoles. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 65, n. 3, p. 260-265, 2009.

ZHANG, Y.. J. et al. A single amino acid substitution in the SdhB protein of succinate dehydrogenase determines resistance to amicarbazol in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 66, n. 6, p. 627-633, 2010.