

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

NADIA MARIA POLONI

**DISTRIBUIÇÃO GENERALIZADA DA RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS
TRIAZÓIS E EVOLUÇÃO DO GENE *cyp51A* EM POPULAÇÕES DE
Pyricularia oryzae DA BRUSONE DO TRIGO NO BRASIL**

Ilha Solteira

2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

NADIA MARIA POLONI

Distribuição generalizada da resistência a fungicidas triazóis e evolução do gene *cyp51A* em populações de *Pyricularia oryzae* da brusone do trigo no Brasil

Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP – Câmpus de Ilha Solteira, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção

Ilha Solteira
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Poloni, Nadia Maria.

P778d Distribuição generalizada da resistência a fungicidas triazóis e evolução do gene *cyp51A* em populações de *Pyricularia oryzae* da brusone do trigo no Brasil / Nadia Maria Poloni. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016
44 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2016

Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Inclui bibliografia

1. Fungo. 2. Sensibilidade. 3. Controle químico. 4. Mutações. 5. Cyp51.
6. Ec50.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DISTRIBUIÇÃO GENERALIZADA DA RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS TRIAZÓIS E EVOLUÇÃO DO GENE *cyp51A* EM POPULAÇÕES DE *Pyricularia oryzae* DA BRUSONE DO TRIGO NO BRASIL 2016.

AUTORA: NADIA MARIA POLONI

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

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



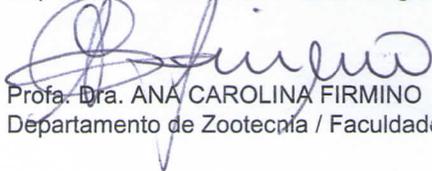
Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. ALCEBIADES RIBEIRO CAMPOS

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Profa. Dra. ANA CAROLINA FIRMINO

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas

Ilha Solteira, 22 de fevereiro de 2016

A minha tia Dete,
Eudete Fochi (*in memoriam*)
Por todas conversas e livros trocados.
Pela influência maravilhosa que foi para mim.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as portas abertas, por me guiar e abençoar por todos os caminhos que segui até agora. Pela força dada em todos os momentos de necessidade e por cultivar a esperança de dias melhores.

Agradeço aos meus pais Nadir e Rui, por sempre acreditarem sempre em mim, também por todo amor, confiança, incentivo e por darem tudo o que precisei.

Às minhas irmãs Katia e Flavia, por serem essenciais na vida e sempre estarem ao meu lado em todas as minhas conquistas, serem meu elo com a infância e também com o futuro. Obrigada por tudo que passamos juntas, e pelo imenso carinho.

À minha família, por sempre me acompanhar nessa jornada, pelo amor recebido e pela felicidade que com ela compartilho.

Ao meu namorado, João Fischer, por todo amor, carinho, amizade, incentivo, ajuda, apoio, compreensão e paciência durante todos esses anos juntos.

À Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (UNESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini pela orientação, tempo e paciência para me auxiliar nessa jornada e em outras de minha vida profissional. E a Dra. Giselle Carvalho por sua ajuda, confiança, apoio, atenção, amizade e por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos de Ilha Solteira, Mariele Squizato, Danilo Istuque, Keylla Brauna e Elis Marina Cabral, pelos os anos de convivência, carinho e bom humor.

Aos meus companheiros de laboratório que se tornaram amigos também para vida. O meu muito obrigada à Vanina Castroagudin, Juliana Reges, Samara Campos, Priscila Casado, Suelen, Danilo Pereira, Adriano Dorigan, Matheus Negrisoli, Diego Feitosa, Tiago Calves e Fernando pela ajuda primordial na condução dos experimentos, troca de experiências, por momentos de descontração e amizade.

Aos meus amigos de longa data, Fabiana e Fernanda Paiola, Miriam Tarumoto, Thatiane Kawabata, Rafaella Rossini, Fernanda Guaresemin, Luana Baroli e Tássila Franco, que estiveram presentes em vários e diferentes momentos da minha vida.

À todos que em algum momento influenciaram minha vida e nunca me negaram ajuda.

RESUMO

O fungo ascomiceto, *Pyricularia oryzae*, tem distribuição mundial como patógeno do arroz, mas recentemente emergiu como patógeno causando a brusone do trigo no Brasil. Os grupos de fungicidas estrobirulinas e triazóis tem sido intensivamente utilizados para manejo de doenças do trigo há cerca de três décadas. Há relato de resistência de *P. oryzae* do trigo a estrobirulinas no Brasil e a ineficácia dos fungicidas triazóis aponta para um cenário semelhante. Os triazóis, inibidores da desmetilação de esteróis (DMI), inibem a biossíntese de ergosterol e possuem como alvo a enzima 14 α -demetilase, codificada pelo gene *cyp51*. Em nosso estudo, determinamos as distribuições de frequência da sensibilidade de 180 isolados de *P. oryzae* do trigo amostrados de sete estados do Centro-Sul do Brasil, com base na EC₅₀ a tebuconazol e epoxiconazol. Descrevemos, também, a presença de mutações no gene *cyp51A* e reconstruímos sua filogenia reticulada para esclarecer a relação evolutiva entre haplotipos. Relatamos que todas as populações de *P. oryzae* amostradas se mostraram insensíveis aos fungicidas testados, comparando-se com as doses recomendadas para o manejo da doença no campo. Com base na sequência do gene *cyp51A* de *P. oryzae* do trigo, foram detectados oito haplotipos distintos. Foram encontradas sete mutações não-sinônimas, que podem estar correlacionadas com a resistência à DMI's.

Palavras-chave: Fungo. Sensibilidade. Controle químico. Mutações. *Cyp51*. EC₅₀.

ABSTRACT

The fungus ascomycete *Pyricularia oryzae* has worldwide distribution as rice pathogen, but it has recently emerged as pathogen causing wheat blast in Brazil. The strobirulin and azole fungicides have been intensively used for management of wheat diseases in the last three decades. The report of resistance of *P. oryzae* from wheat to strobirulins in Brazil and the inefficiency of azole fungicides indicates a similar scenario. The triazoles represented sterols demethylation inhibitor fungicides group (DMI), characterized by inhibiting the biosynthesis of ergosterol and their target is the 14 α -demethylase enzyme, encoded by the *cyp51* gene. We determined the azole sensitivity frequency distributions of 180 isolates of *P. oryzae* of wheat sampled in seven states of the south-central Brazil, based on the EC₅₀ of tebuconazole and epoxiconazole. We described the presence of mutations in the *cyp51A* gene and built their reticulate phylogeny to identify the evolutionary relationship among haplotypes. We reported that all *P. oryzae* populations sampled were insensitive to the azoles when compared to the recommended doses for the management of the disease in the field. Based on the sequence of *cyp51A* gene from *P. oryzae* of wheat, eight distinct haplotypes were detected. We found seven non-synonymous mutations that could be correlated with resistance to DMI's.

Key words: Fungus. Sensitivity. Chemical control. Mutations. *Cyp51*. EC₅₀.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	<i>Pyricularia oryzae</i>	9
2.2	ETIOLOGIA	9
2.3	BRUSONE DO TRIGO	9
2.3.1	SINTOMATOLOGIA	10
2.3.2	CICLO DA DOENÇA	10
2.3.3	CONTROLE DA BRUSONE	11
2.4	RESISTÊNCIA DE FUNGICIDAS DMI'S	12
2.4.1	PARÁLOGOS DO GENE <i>cyp51</i>	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	AMOSTRAGEM DE POPULAÇÕES DE <i>Pyricularia oryzae</i> DO TRIGO	14
3.2	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS FUNGICIDAS TRIAZÓIS TEBUCONAZOL E EPOXICONAZOL	15
3.3	ANÁLISES MOLECULARES	16
3.3.1	EXTRAÇÃO DE DNA	16
3.3.2	DESENVOLVIMENTO DOS PRIMERS	16
3.3.3	REAÇÕES DE PCR E SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>CYP51A</i>	17
4	RESULTADOS	19
4.1	VARIAÇÃO NA SENSIBILIDADE DE POPULAÇÕES DE <i>P. oryzae</i> DE TRIGO A FUNGICIDAS DMI'S	19
4.2	DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NA SEQUÊNCIA DO GENE <i>cyp51A</i> DE <i>P. oryzae</i>	22
5	DISCUSSÃO	27
5.1	A DISTRIBUIÇÃO GENERALIZADA DA RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS TRIAZÓIS NO PAÍS	27
5.2	MUTAÇÕES PONTUAIS, EVOLUÇÃO DO GENE <i>cyp51A</i> DE <i>P. oryzae</i> DO TRIGO E A ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA A TRIAZÓIS	29
6	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O fungo Ascomiceto *Pyricularia oryzae* é um fitopatógeno que causa perdas elevadas à produção de culturas agrícolas de importância mundial e foi classificado em 1º lugar na lista dos 10 fungos fitopatogênicos com maior relevância econômica. (1, 2, 3, 4) A emergência da brusone do trigo é relativamente recente e suas primeiras epidemias no Brasil foram relatadas em 1985 no estado do Paraná (5), e desde então, espalhou-se para outros países que cultivam trigo na América do Sul, como Bolívia, Argentina e Paraguai. (6) O fungo *P. oryzae* foi recentemente identificado como agente causal de brusone em cevada, centeio e triticale em áreas do Centro-Oeste e na região Sul do Brasil. (7)

Uma das estratégias de manejo da brusone é o uso de fungicidas, mas estima-se que a eficiência do controle químico com fungicidas seja de, no máximo, 50% (8, 9), e este nível de eficiência é ainda menor em condições climáticas muito favoráveis à doença. (8)

Dentre os fungicidas e doses registradas no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em trigo visando o controle da brusone, pode-se listar 28 fungicidas, dos quais 11 pertencem ao grupo químicos dos triazóis, e 7 deles são misturas de triazol e estrobirulina. (10) Esses grupos têm sido utilizados de forma intensiva para manejo das ferrugens do trigo entre uma a três décadas, respectivamente. (11, 12, 13) Entretanto, em nenhum momento foi sugerido que a baixa eficiência dos fungicidas para manejo da brusone estivesse associada com emergência de resistência nas populações do patógeno. Há relato de resistência de *P. oryzae* do trigo a estrobirulinas de forma generalizada no país (14) e a ineficácia dos fungicidas triazóis possivelmente aponta para um cenário semelhante de resistência.

Os triazóis ou fungicidas inibidores da desmetilação de esteróis (DMI), caracterizam-se por inibir a biossíntese de ergosterol, componente essencial da membrana celular dos fungos. (15) Possuem como alvo a enzima 14 α -demetilase, a qual é codificada pelo gene *cyp51*, membro da família do citocromo P450. (16)

Mutações pontuais não sinônimas identificadas em genes que codificam para a proteína alvo do fungicida triazol tem sido frequentemente ligadas à resistência. (17)

Embora a ocorrência de mutações pontuais não seja o único mecanismo de resistência, para alguns fungos fitopatogênicos foi observada correlação entre estas mutações e a diminuição da sensibilidade aos fungicidas DMIs, especialmente para espécies do gênero *Mycosphaerella*, como *Mycosphaerella graminicola*, agente causal da septoriose em trigo (18) e para *Mycosphaerella fijiensis*, patógeno da sigatoka negra (19). Entretanto, outros mecanismos podem contribuir para resistência, principalmente devido a natureza poligênica da resistência aos fungicidas DMI's (20).

Nesse estudo, testamos a hipótese de que o uso intensivo de fungicidas triazóis por vários anos na cultura do trigo para controle de manchas foliares e ferrugens, levou a emergência de resistência aos DMI's. Assim, os objetivos do trabalho foram: i) determinar as distribuições de frequência da sensibilidade de 180 isolados de *P. oryzae* do trigo amostrados de sete estados do Centro-Sul do Brasil, com base na EC_{50} a tebuconazol e epoxiconazol; ii) investigar a presença de mutações no gene *cyp51A* e se há correlação com a redução da sensibilidade a fungicidas DMI's nas diferentes populações amostradas; iii) reconstruir a história filogenética reticulada do gene *cyp51A* para esclarecer a relação evolutiva entre haplotipos do patógeno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Pyricularia oryzae*

O fungo *Pyricularia oryzae* encontra-se na classe de fitopatógenos com alto risco de desenvolvimento de resistência a fungicidas, conforme lista elaborada pelo Comitê de Ação à Resistência a Fungicidas – *Fungicide Resistance Action Committee* FRAC (21). De fato, devido ao potencial de dispersão a longas distâncias pelo vento e por sementes infectadas (22, 23, 24), *P. oryzae* é uma espécie que apresenta elevada capacidade de fluxo gênico e genotípico (25). Por apresentar tais características dispersivas, além da predominância de um sistema reprodutivo misto, *P. oryzae* está incluída na categoria mais elevada de alto potencial evolutivo (26)

2.2 ETIOLOGIA

Por muitos anos, espécies de *Pyricularia* foram nomeadas em sua fase sexual como *Magnaporthe* spp., mas recentemente sugeriu-se a utilização do gênero *Pyricularia* tanto para a fase assexuada como para a fase sexuada (27, 28) de acordo com o Novo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (29).

Baseado em três genes de *Pyricularia*, actina, beta-tubulina e calmodulina, foi possível a separação em dois cladogramas distintos, *P.oryzae* e *P. grisea*, mesmo sem apresentar distinção morfológica entre eles. A principal distinção entre os dois fungos foi a planta hospedeira. Um grupo consistiu em isolados de *Digitaria*, identificados como *P. grisea*, e o outro grupo, *P. oryzae*, incluía isolados associados com arroz (*Oryza sativa*), e outras gramíneas como *Triticum*, *Setaria*, e *Panicum* (30). Segundo o estudo, para identificar isolados associados com a brusone do trigo e arroz, a nomenclatura adotada atualmente é *P. oryzae*.

2.3 BRUSONE DO TRIGO

A brusone é considerada uma doença de difícil controle (31). As estratégias recomendadas para o seu manejo baseiam-se principalmente no uso de fungicidas aplicados na parte aérea e na diversificação de cultivares, dando preferência àquelas menos suscetíveis (3) embora estudos anteriores indicaram que algumas cultivares

de trigo cultivadas no Brasil mostraram resistência à brusone no estágio de espigamento, nenhuma das cultivares testadas em estudo recente mostrou resistência a todos os patótipos de *P. oryzae* detectados (25). Os autores detectaram a ocorrência de oito grupos de virulência no Centro-Sul do Brasil, 'Anahuac 75', 'BR 24', 'MGS 3 Brilhante', 'BR 18 Terena', 'BRS 220', 'BRS Buriti', 'BRS 229' 'CNT-8', com diferentes reações de virulência aos 14 patótipos identificados na população de *P. oryzae*.

2.3.1 SINTOMATOLOGIA

O fungo causa lesões em toda parte aérea na planta de trigo incluindo folhas, panículas, caules, bainhas, nós, colmos, pedúnculo e glumas. A infecção da espiga é a forma mais destrutiva de ocorrência da doença, com branqueamento parcial ou total, esterilidade ou chochamento de grãos. Os sintomas iniciais nas folhas caracterizam-se por pequenas manchas elípticas de coloração marrom-escura a negra. (32) Além disso, infecta sementes, presumivelmente o principal meio de transmissão da brusone (33). Sua importância econômica decorre da redução no rendimento e na qualidade dos grãos que, quando infectados, apresentam-se enrugados, pequenos, deformados e com baixo peso específico (34). As perdas, em peso, por espiga chegam até 72,5% dependendo da época de infecção (34).

2.3.2 CICLO DA DOENÇA

A disseminação dos esporos do fungo *P. oryzae* ocorre pelo vento, podendo ser deslocados a longas distâncias (35). As condições ótimas para o desenvolvimento da doença variam entre 21-27 °C e 10-14 horas de molhamento das espigas (36). Pode também ser disseminado por plantas hospedeiras, restos de culturas e sementes contaminadas.

O fungo *P. oryzae* apresenta um elevado número de hospedeiros alternativos (37, 38, 30, 39, 40, 41) como as do gênero *Urochloa* spp, e espécies como *Panicum maximum*, *Digitaria sanguinalis*, *Eleusine indica* *Setaria geniculata* e *Cenchrus echinatus* (38, 42, 43). Plantas invasoras próximas a áreas de cultivo de trigo que não necessariamente são expostas às pulverizações de fungicidas podem servir de fonte contínua e ininterrupta de inóculo do patógeno.

Uma outra fonte de inóculo importante para a doença são os restos culturais, uma vez que o fungo é hemibiotrófico (44) e desenvolve-se saprofiticamente nos restos culturais do trigo. As sementes contaminadas, podem constituir uma fonte de inóculo inicial importante, introduzindo o fungo em novas áreas (45, 46, 47).

2.3.3 CONTROLE DA BRUSONE

A brusone do trigo tem sido um dos gargalos na produção tritícola brasileira, causando aumento dos custos e quedas na produtividade (34). Com a intenção de minimizar o impacto do patógeno na cultura do trigo, algumas medidas de manejo tem sido propostas como o uso de sementes saudáveis, eliminação de plantas hospedeiras, rotação de cultura, uso de cultivares resistentes, incorporação de restos culturais, época de semeadura, e controle químico (48). Porém, muitas dessas estratégias tem sua eficiência limitada, como o uso de sementes saudáveis, que tem importante função ao reduzir o inóculo inicial, mas tem sua eficácia limitada por outras vias de disseminação do inóculo (49). O uso de cultivares resistentes também apresenta dificuldades devido a ampla variação genética do fungo (31). As diversas e inconstantes condições climáticas são apontadas como as principais dificuldades do controle pela época de semeadura, que tem por objetivo evitar condições favoráveis à ocorrência da doença por ocasião do espigamento do trigo (48). O controle químico, embora viabilize técnica e economicamente a produção de trigo, é uma das práticas agrícolas que mais onera os custos de produção. Segundo Urashima, Lavorent (50) fungicidas com bom desempenho no controle da brusone do arroz não se mostram eficientes na proteção de panículas do trigo.

A baixa eficiência dos fungicidas foi associada às dificuldades no alcance do alvo, em decorrência das características inerentes ao sítio de infecção (espiguetas das panículas) (51), da elevada diversidade de isolados quanto aos padrões de virulência (50), às condições de alta favorabilidade do ambiente, ao alto grau de suscetibilidade das cultivares (52), e a própria ineficácia do princípio ativo do fungicida utilizado contra o patógeno. (22, 31, 8, 9)

2.4 RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS DMI'S

Em termos de distribuição mundial, a resistência a DMI's tem sido observada na Europa, América Central e América do Sul para um grupo diverso de fitopatógenos, como para *Blumeria jaapi* (53, 54), *Blumeria graminis* (55, 56), *Monilinia fructicola* (57, 58), *Penicillium digitatum* (59, 60, 61), *Tapesia yallunda* (62), *Erysiphe graminis* (63), *Uncinula necator* (64), *Venturia inaequalis* (65), *Fusarium asiaticum* e *Fusarium graminearum*. (66)

Em patógenos de plantas e de humanos, a resistência aos fungicidas DMI's pode ser determinada por três principais mecanismos: (i) alteração de sítio-alvo, causadas por mutações pontuais que provocam alterações no sítio bioquímico alvo. Essas mutações gênicas podem ocorrer em genes nucleares ou em genes codificados mitocondrialmente (67); e, geralmente, resultam em altos níveis de resistência (68) ii) a produção excessiva de proteína alvo pelo gene *cyp51*, resultando em altos níveis de esterol 14 α – desmetilase; (iii) aumento do efluxo de DMIs, em que proteínas situadas na membrana bombeiam compostos tóxicos para fora da célula fúngica. Esse mecanismo envolve as proteínas transportadoras ABC (*ATP Binding Cassete*) que na medicina é conhecido como resistência a múltiplas drogas (ou MDR). (68)

Relatos até o ano de 2007 indicaram que, em países europeus, a resistência a fungicidas DMI decorreu, principalmente, por mudanças no gene *cyp51*. (69) Até esta data, 22 alterações de aminoácidos diferentes (substituições e deleções) foram detectadas no gene *cyp51* em populações de *Mycosphaerella graminicola* na Europa Ocidental, fitopatógeno para o qual há maior volume de informação sobre a emergência de resistência a fungicidas no agroecossistema do trigo. Estudos com esse patógeno detectaram uma grande variação na sensibilidade de populações baseline dos isolados aos fungicidas DMI (20, 70), com diferenças de até 40 vezes entre isolados de um mesmo país. Segundo Leroux, Albertini (68) foram encontradas várias substituições de aminoácidos em isolados de campo de *M. graminicola* que expressavam diferentes níveis de sensibilidade aos fungicidas DMI.

2.4.2 PARÁLOGOS DO GENE *cyp51*

Entre os fatores ligados à resistência a DMI's, a importância da contribuição de diferentes parálogos do gene *cyp51*, genes originados a partir de um processo de duplicação gênica dentro da mesma espécie, tem sido investigada sob três contextos: (i) no contexto evolutivo e da re-emergência de parálogos, fenômeno pelo qual algum parálogo pode perder-se devido ao cruzamento entre múltiplas linhagens de um fitopatógeno, mas ele também pode re-emergir devido à adaptação a novos compostos por seleção a partir da variação genética (73); ii) no contexto funcional, com o nocaute de parálogos, ocorre a inibição de um determinado gene, para que se possa determinar sua verdadeira função pelas alterações que ocorrerão no metabolismo após o seu desligamento (74, 75, 76); iii) no contexto do papel de mutações pontuais nos diferentes parálogos do gene *cyp51*.

O número de parálogos do *cyp51* varia de acordo com a espécie do fungo, especialmente em Pezizomycotina, subfilo de Ascomycota, que compreende muitos patógenos de plantas e humanos. (77) Entre as espécies de fitopatógenos, foram descritos genes parálogos de *cyp51* para *Aspergillus fumigatus* (78), *P. oryzae* (75), *Penicillium digitatum* (79), *Rhynchosporium commune* (80) e *Fusarium graminearum*. (81) Especialmente em *P. oryzae* foram identificados dois genes parálogos do *cyp51*: *cyp51A* (MGG_04632.6) e *cyp51B* (MGG_04432.6) (82). O *cyp51A*, com 1548 pb sem íntrons, que codifica uma proteína com 515 aminoácidos (aa) e o *cyp51B*, com 1710 pb, um íntron de 129 pb, que codifica para uma proteína de 526 aa. (75)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM DE POPULAÇÕES DE *Pyricularia oryzae* DO TRIGO

Os isolados utilizados neste estudo pertenciam a coleção do laboratório, e as amostragens e isolamento do fungo foram realizados como descrito. As amostragens foram realizadas em sete locais cultivados com trigo ao longo de 2012. As populações brasileiras de *P. oryzae* adaptadas ao trigo foram amostradas usando-se o sistema de transecto, em campos, com ocorrência natural da brusone no Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Goiás (GO) e Distrito Federal (DF), que inclui a maior parte das áreas de cultivo de trigo no Brasil (Tabela 1). O isolamento do patógeno foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Maciel et al, (2013). (26) De cada espiga infectada foi obtido apenas um isolado monospórico.

Tabela 1- Descrição de populações de *Pyricularia oryzae* amostradas de áreas de trigo

Ano de Coleta	População	Variedade de trigo	Local	Número de isolados
2012	Distrito Federal/ Goiás	BRS 254/ BR 18	Brasília, DF/ Rio Verde, GO	26
	Minas Gerais	BRS 264 e BR	Patrocínio e Perdizes,	27
	Mato Grosso do Sul	BRS	Amambaí e Aral	44
	Paraná	CD 104	Londrina, PR	36
	Rio Grande do Sul	Desconhecida	Passo Fundo, São Luiz Gonzaga, São Borja e Três de Maio,RS	19
	São Paulo	CD 116	Itaí, SP	28
	Total

Um total de 180 isolados de seis populações, pela sobreposição geográfica, as populações do DF e de GO foram unidas em uma única, foram avaliados nesse

estudo, os quais foram previamente genotipados utilizando um conjunto de 12 loci microssatélites e identificados como distintos genótipos multiloci. (83, 14) Um total de 51% desses isolados carregam o alelo do *cytb* que confere resistência a estrobirulina. (14)

3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS FUNGICIDAS TRIAZÓIS TEBUCONAZOL E EPOXICONAZOL

A escolha das doses foi baseada em uma curva de crescimento micelial obtida em um experimento prévio, realizado com 16 isolados e 12 doses dos fungicidas, seguindo o mesmo procedimento deste estudo e, descrito a seguir. Os fungicidas tebuconazol, 200g L⁻¹, e epoxiconazol 75g L⁻¹, foram diluídos, separadamente, a 1:100 em água deionizada para produção de uma solução estoque.

Discos de culturas de *P. oryzae* de 5 mm de diâmetro cultivadas por sete dias foram transferidos para placas de petri contendo meio de BDA (batata-dextrose-ágar, KASVI, Curitiba, PR, Brasil) suplementado com cloranfenicol e estreptomicina (50 µg mL⁻¹) e diferentes concentrações finais dos fungicidas. Para tebuconazol as concentrações foram de: 0; 0,3; 0,75; 0,9; 1,8; 4,1 e 6,8 µg mL⁻¹ ou ppm e para epoxiconazol 0, 0,04, 0,1, 0,3, 0,68, 1,0, e 2,0 µg mL⁻¹.

Quatro isolados foram transferidos simultaneamente para cada placa e cada tratamento, representado por um único isolado distinto, foi repetido quatro vezes. As placas foram incubadas à 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O diâmetro das colônias foi mensurado cinco dias após a transferência, subtraindo-se o diâmetro original do disco de micélio. O crescimento micelial de *P. oryzae* nas diferentes doses foi convertido em crescimento relativo (RG): $100 \times (\text{diâmetro médio da colônia em meio com fungicida}) / (\text{diâmetro médio da colônia em meio sem fungicida})$. Para o cálculo dos valores de EC₅₀ (concentração efetiva - µg mL⁻¹ capaz de inibir 50% do crescimento micelial) de cada isolado, utilizou-se o programa ED50plus v1.0 (84), utilizando-se as concentrações finais dos fungicidas convertidas em log, e os dados de crescimento relativo.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados e o experimento repetido duas vezes. A análise de variância (ANOVA) e o teste de médias (Scott-Knott)

a 5% de probabilidade foram efetuados utilizando-se o ambiente R e o pacote estatístico Agricolae. (85)

3.3 ANÁLISES MOLECULARES

3.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

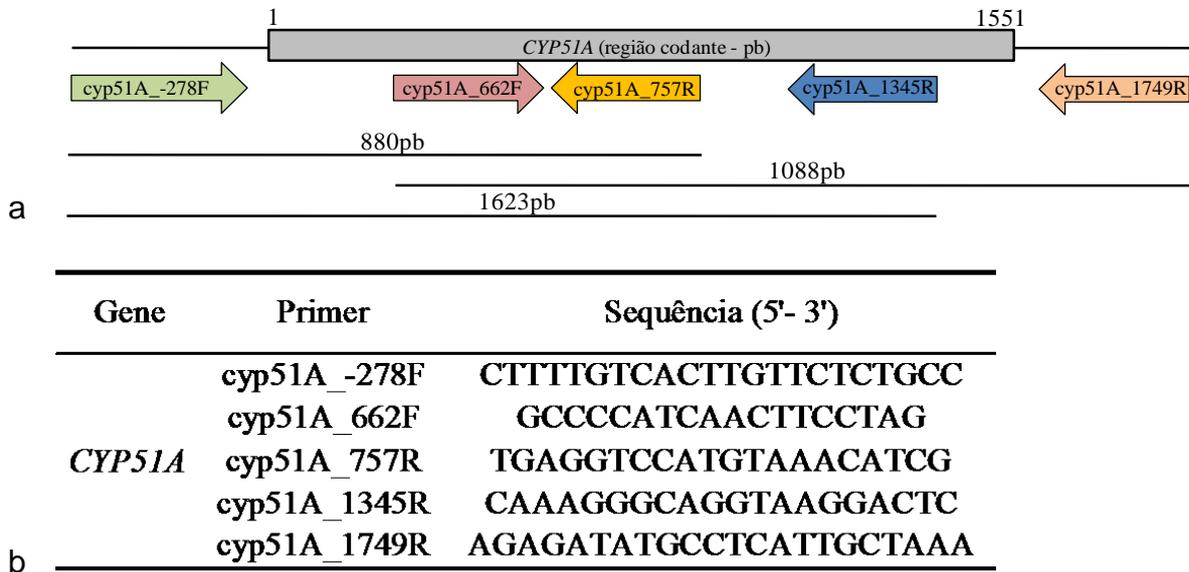
Os isolados foram cultivados em meio líquido BD (batata-dextrose, Himedia, Mumbai, MA, Índia) durante sete dias a 24°C sob agitação a 150 rpm para obtenção de massa micelial. O micélio liofilizado de 180 isolados foi utilizado para extração de DNA usando-se o kit *Gen Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA) e diluído para concentração final de 25 ng μL^{-1} .

3.3.2 DESENVOLVIMENTO DOS PRIMERS

Os iniciadores (*primers*) foram desenhados com o auxílio do programa Geneious R 6.7.1 (Biomatters, Nova Zelândia) utilizando-se como referência a sequência do *cyp51A* de *P. oryzae* de trigo - BR32 "M_BR32_EuGene_00088761" (Chiapello et al., 2015). Para amplificação total do gene *cyp51A* de *P. oryzae* foram utilizadas três combinações de primers, de acordo com o apresentado na figura 1.

Foram produzidos três fragmentos oriundos das combinações de primers: 1) *cyp51A*_-278F + *cyp51A*_757R; 2) *cyp51A*_-278F + *cyp51A*_1345R e 3) *cyp51A*_662F + *cyp51A*_1749R. As sequências dos *primers* e o tamanho esperado dos fragmentos gerados a partir de cada combinação está representado na figura 1.

Figura 1- Esquema representativo da sequência do gene *cyp51A* de *P. oryzae* do trigo e os *primers* utilizados nesse trabalho. (a) Desenho ilustrativo do gene *cyp51A* de *P. oryzae* do trigo e a localização dos *primers* de acordo com a posição em pb (pares de base) da sequência. (b) Código e sequência dos *primers* (5'- 3').



Fonte: próprio autor

3.3.3 REAÇÕES DE PCR E SEQUENCIAMENTO DO GENE *cyp51A*

As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 25 µL contendo água ultra pura destilada, 50 ng de DNA total, 0,3 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão 10X e 1U de Taq DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, EUA). As amplificações foram realizadas em termociclador ProFlex (Applied Biosystems, EUA), com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram enviados e submetidos à reação de sequenciamento (Macrogen Inc., Coréia do Sul), utilizando-se sequenciador automático PE Applied Biosystems ABI-3730. As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas no programa Geneious R 6.7.1 (Biomatters, Nova Zelândia), utilizando-se como referência a sequência *cyp51A* de *P. oryzae* do trigo - BR32 (86) e *cyp51* do ascomiceto *Mycosphaerella graminicola* (EF418622) (68), agente causal da septoriose do trigo, para o qual há descrição detalhada das mutações associadas com resistência a triazóis. Além disso, para esse fitopatógeno existem isolados definidos como padrão de sensibilidade e valores de EC₅₀ para os mesmos fungicidas desse

estudo. (68, 87, 88, 89) O número de haplotipos de *cyp51A* de *P. oryzae* foi determinado utilizando-se o programa DnaSP versão 5.10.1 (90) e a relação entre os haplotipos distintos foi determinada baseando-se em análise de filogenia reticulada, pelo do método de parcimônia estatística implementado no programa TCS versão 1.21. (91) Duas sequências de *P. oryzae* do arroz foram incluídas como referência na análise, a sequência do isolado *P. oryzae* P131, amostrado em área de cultivo de arroz no Japão no ano de 1988 (92) e do isolado *P. oryzae* 70-15, resultante de um cruzamento realizado em laboratório (GUY11 x CH104-3) (93), e que teve seu genoma sequenciado por Dean et al. (2005). A sequência do gene *cyp51* do isolado BR32 de *P. oryzae* de trigo foi também adicionado na análise. (86)

Os valores de EC_{50} médios foram comparados com as doses dos fungicidas aplicados em campo, com base na recomendação da bula de cada fungicida, e considerando uma planta de trigo de 0,82 m, fase de espigamento, em um hectare de cultivo de trigo.

4 RESULTADOS

4.1 VARIAÇÃO NA SENSIBILIDADE DE POPULAÇÕES DE *P. oryzae* DE TRIGO A FUNGICIDAS DMI'S

Os dois fungicidas triazóis proporcionaram redução do crescimento micelial do fungo em função do aumento da concentração do ingrediente ativo (Figuras 2a e 2b). Detectou-se diferença significativa entre populações de *P. oryzae* para isolados dentro de populações quanto à EC₅₀ para os fungicidas tebuconazol e epoxiconazol (Tabela 2).

Quanto às diferenças significativas na sensibilidade de isolados aos fungicidas triazóis, para ilustrar os extremos dessas diferenças, observou-se que o menor e o maior valor de EC₅₀ variou de 0,673 a 1,246 µg mL⁻¹ para os isolados 121048i e 121130, respectivamente (Figura 2c). Para o fungicida epoxiconazol observou-se que o menor e o maior valor de EC₅₀ foram de 0,5026 e 0,894 µg mL⁻¹, para os isolados 121024i e 121265, respectivamente (Figura 2d).

As populações de *P. oryzae* apresentaram variação na sensibilidade aos fungicidas tebuconazol (Figura 3a) e epoxiconazol (Figura 3b).

Tabela 2- Análise de variância (ANOVA) baseada em valores de EC₅₀ de 180 isolados amostrados em 6 populações de *Pyricularia oryzae* de trigo para os fungicidas tebuconazol e epoxiconazol

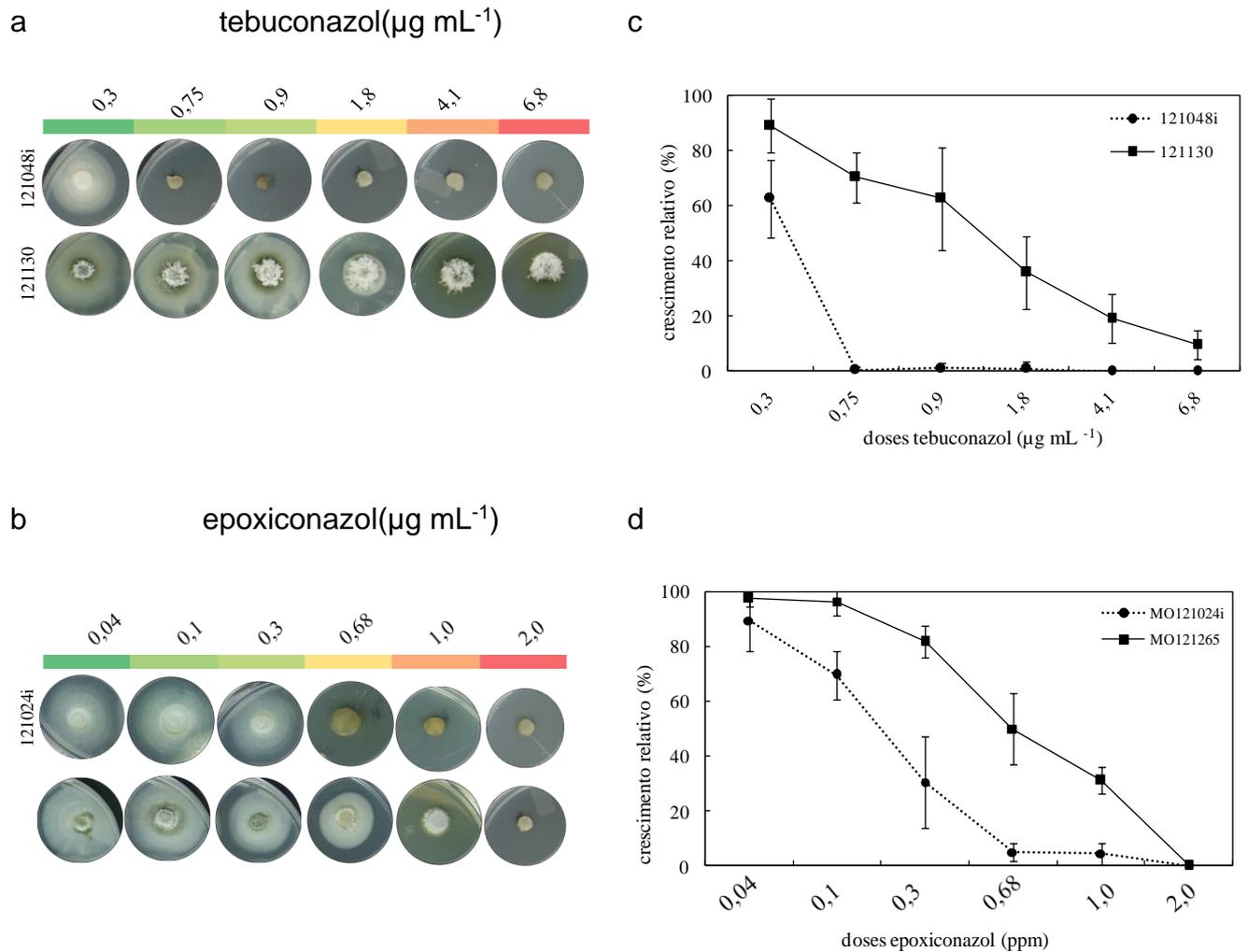
Fungicida	F.V.	G.L.	Q.M.	F	Pr>F
Tebuconazol	Exp	1	4,784	883,648	<2e-16 ***
	Rep	6	0,011	2,002	0,0625
	Pop	5	0,151	27,931	<2e-16 ***
	Pop:Isol	174	0,034	6,268	<2e-16 ***
	Resíduo	1242	0,005		
Epoxiconazol	Exp	1	0,09368	58,969	3,22e-14 ***
	Rep	6	0,00892	5,612	9,25e-06 ***
	Pop	5	0,10643	66,994	<2e-16 ***
	Pop:Isol	174	0,00976	6,141	<2e-16 ***
	Resíduo	1244	0,00159		

Fonte: próprio autor

Ausência de interação significativa ($p \leq 0,001$) entre Exp*Pop

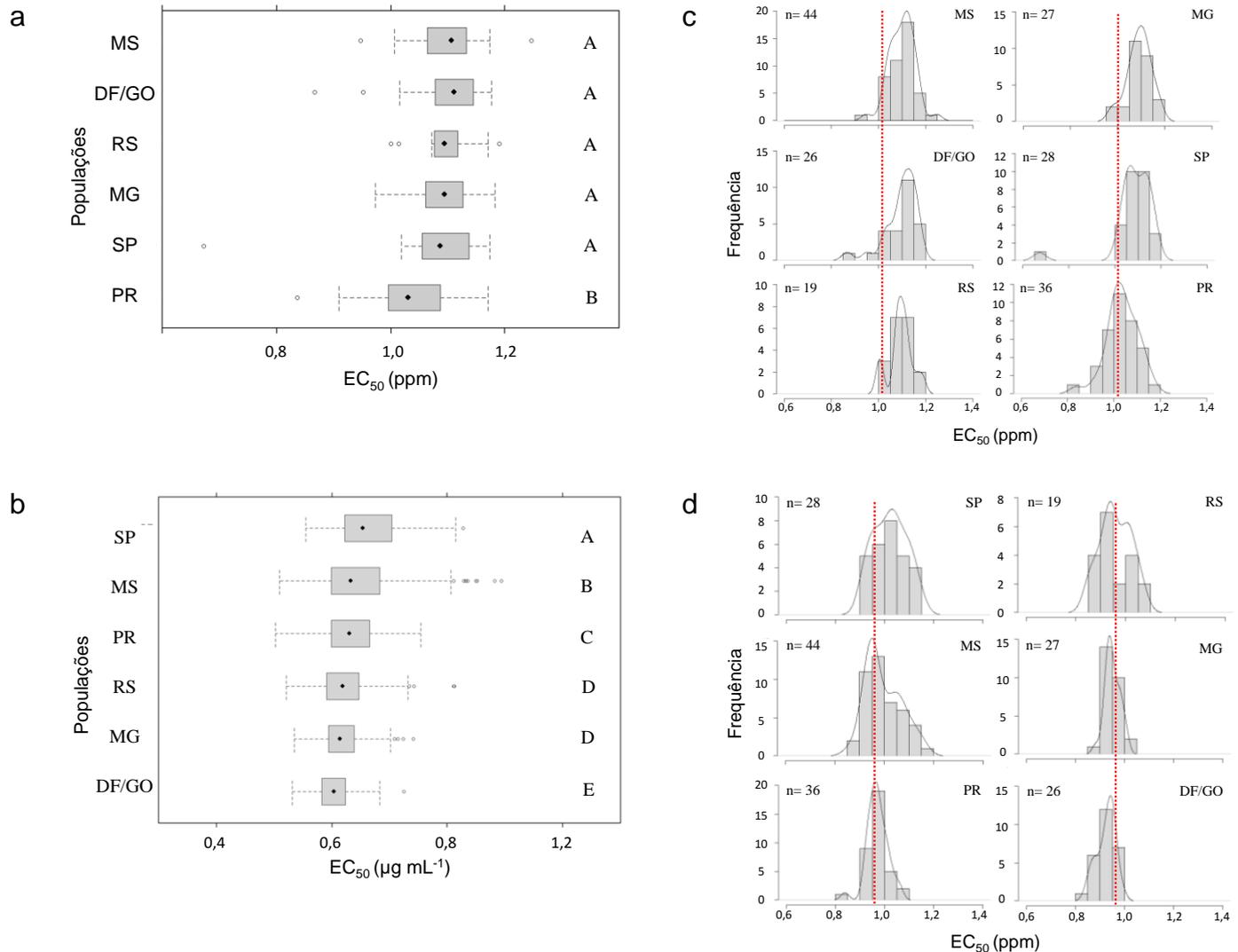
*** Significativo pelo teste F a $p \leq 0,001$

Figura 2- Variação da sensibilidade *in vitro* de isolados contrastantes de *Pyricularia oryzae* em meio BDA com doses crescentes dos fungicidas DMI's tebuconazol (a) e epoxiconazol (b). Crescimento relativo de isolados que apresentaram maior e menor EC₅₀ em resposta ao aumento das concentrações de tebuconazol (c) e epoxiconazol (d)



Fonte: próprio autor

Figura 3- Variação de EC_{50} de populações de *Pyricularia oryzae* do trigo do centro sul do Brasil ^{1, 2}.



Fonte: próprio autor

¹Diagramas de caixas (*boxplots*) representando a variação dos valores de EC_{50} para as populações de *P. oryzae* oriundas de MS, DF/GO, RS, MG, SP e PR submetidas aos fungicidas tebuconazol (a) e epoxiconazol (b). O ponto dentro de cada caixa representa a média. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente a $p < 0,05$ pelo teste de *Scott-Knott* para médias de EC_{50} das populações (média de oito repetições combinando-se as duas réplicas do experimento) (a e b).

²Distribuição da frequência de isolados *P. oryzae* em relação aos valores de EC_{50} obtidos para os fungicidas tebuconazol (c) e epoxiconazol (d). A linha vertical pontilhada vermelha indica a média geral do EC_{50} obtida para os fungicidas tebuconazol (c) e epoxiconazol (d).

Os valores de EC_{50} apresentaram distribuição normal dos dados para todas as populações avaliadas, com valor médio geral de $1,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ para tebuconazol e epoxiconazol, respectivamente (Figuras 3c e 3d). Quando submetidas ao tebuconazol, as populações do MS, DF/GO, RS, MG e SP não diferiram significativamente entre si, apresentando média de EC_{50} de $1,092 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na população do PR detectou-se média de EC_{50} de $1,035 \mu\text{g mL}^{-1}$, significativamente menor que o das outras populações avaliadas (Figura 3a). Para o fungicida epoxiconazol, as populações de *P. oryzae* amostradas em SP, MS e PR apresentaram os maiores valores de EC_{50} , $0,6389$, $0,6306$ e $0,6301 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, significativamente diferentes entre si e das demais populações amostradas. As populações do RS e MG foram não diferiram significativamente entre si apresentando valores intermediários de EC_{50} , $0,6272$ e $0,6273 \mu\text{g mL}^{-1}$, em relação às outras populações analisadas. A menor média de EC_{50} , $0,624 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi detectada na população do DF/GO. (Figura 3b).

4.2 DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NA SEQUÊNCIA DO GENE *CYP51A* DE *P. oryzae*

Todas as combinações de *primers* utilizadas foram eficientes na amplificação da sequência alvo e produziram fragmentos de acordo com o tamanho esperado de 880 pb, 1088 pb e 1623 pb. Obteve-se a sequência completa do gene *cyp51A* para os 180 isolados amostrados, sendo que para alguns pontos do gene foram geradas de 2 a 3x de cobertura, conforme esquema apresentado na figura 1. Inicialmente, as 180 sequências de *cyp51A* foram comparadas com a sequência referência de *P. oryzae* de trigo - BR32. (86) Mutações não-sinônimas são tipos de mutações pontuais onde um único nucleotídeo é mudado provocando uma substituição de um aminoácido, já as mutações sinônimas são mutações do DNA que não resultam numa mudança da sequência de aminoácidos de uma proteína. Foram identificadas 14 mutações ao longo da sequência de 1551 pb do gene *cyp51A*, sendo oito do tipo sinônima (G42A, T78A, G408A, C462T, G498C, G534A, T675C, C1392G) e seis não-sinônimas (V10D, K158R, E334V, R375C, L466K, R512L) (Tabela 3).

Tabela 3- Alinhamento das sequências do gene *cyp51A* de *P. oryzae* evidenciando as variações encontradas entre os 180 isolados amostrados que foram classificados em 8 haplotipos. Os dados de frequência e média de EC₅₀ obtidas para cada haplotipo e fungicida também estão apresentados

				Posição (pb) ^a	29	42	78	408	462	473	498	534	675	788-790	906	927	1001	945	1083	1117	1392	1396	1532
				Referência ^b	T	G	T	G	T	A	G	G	T	AAG	G	C	A	A	A	C	C	C	G
				Não sinônima	*					*				*			*			*		*	*
				Tipo mutação ^c	v	t	v	t	t	t	v	t	t	t	t	v	v	t	t	t	v	v	v
				Substituição aa	V10D	S	I	Q	P	K158R	S	V	F	E788-790Q	L	S	E334V	A	T	R375C	L	L466K	R512L
Haplotipo	Frequência	Tebuconazol Média EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Epoxiconazol Média EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Mutações																			
H1	171	1,08 (0,67 - 1,24)	0,97 (0,84 - 1,16)
H2	1	1,07	0,93	T	.	.	.	
H3	2	1,03 (0,94 - 1,13)	0,96 (0,84 - 1,08)	A	
H4	2	1,10 (1,05 - 1,15)	1,01 (1,01 - 0,93)	T
H5	1	1,12	0,97	A	.
H6	1	1,15	0,92	G	.	.	
H7	1	1,10	0,94	T	
H8	1	1,00	0,94	.	A	A	A	C	G	C	A	C	
Ref. P131 ^d	1	nd	nd	.	A	A	A	C	G	C	A	C	AAG	T	T	.	G	G	
Ref. 70-15 ^d	1	nd	nd	.	A	A	A	C	G	C	A	C	---	T	T	.	G	G	

^a posição mostrada está de acordo com a referência utilizada para o alinhamento

^b sequência observada no gene *cyp51A* do isolado *P. oryzae* de trigo BR32 usado como referência

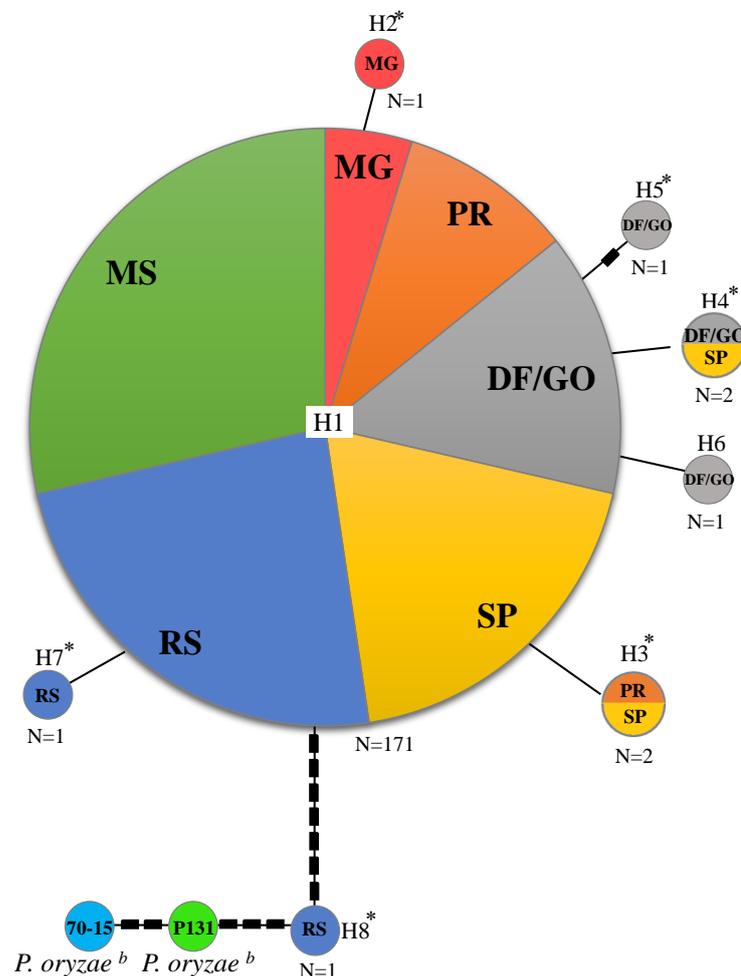
^c t = transições e v = transversões

^d sequências de isolados de *P. oryzae* de arroz

nd – não determinado

Na Tabela 3 também foram incluídas duas sequências de isolados de *P. oryzae* do arroz, (P-131 e 70-15), observou-se a existência de 13 mutações que diferenciam *P. oryzae* de trigo e *P. oryzae* de arroz, sendo que oito delas foram também compartilhadas pelo H8 (G42A, T78A, G408A, C462T, K158R G498C, G534A, T675C), e as outras cinco foram as alterações E788-790Q, G906T, C927T, A945G e A1083G. A Figura 4 representa a rede de haplotipos que sumariza a distribuição geográfica e as relações entre os alelos do gene *cyp51A*.

Figura 4- Rede de haplotipos de isolados de *P. oryzae* do trigo para o gene *cyp51A* oriundos de diferentes populações



Fonte: próprio autor

A área de cada círculo é proporcional ao número de isolados amostrados em cada haplotipo. A relação entre os haplotipos está representada por uma linha referente a um passo mutacional. Os retângulos pretos representam haplotipos não amostrados. Haplotipos *cyp51A* são mostrados ao lado de cada círculo e os * representam haplotipos com mutações não sinônimas.

^aDuas sequências de *P. oryzae* do arroz foram incluídas como referência, P131, (92) e 70-15 (82) A sequência do gene *cyp51* do isolado BR32 de *P. oryzae* de trigo foi também adicionado na análise e correspondeu ao H1.

Todas as populações foram representadas dentro do maior grupo de haplotipos (H1), composta por 171 isolados. Além do haplotipo H1, a população do MS não apresentou outro isolado com eventos de mutação, entretanto, as demais populações apresentaram um (MG e PR), dois (SP e RS) e três isolados (DF/GO) com mutações em relação ao haplotipo referência (H1). Em MG detectou-se o haplotipo H2, em SP o haplotipo H3, no RS os haplotipos H7 e H8 e no DF/GO os haplotipos H4, H5 e H6 (Figura 4).

Avaliou-se a presença de mutações não-sinônimas entre as sequências de *cyp51* de *M. graminicola* (relativo ao padrão de sensibilidade - Tri S) em resíduos correspondentes de *P. oryzae* de trigo. Também foram incluídas na análise as sequências de dois isolados de *P. oryzae* de arroz (P131 e 70-15) para os quais as mudanças de aminoácidos foram idênticas as de todos haplotipos de trigo. Foram observadas sete mutações não-sinônimas, sendo quatro idênticas às descritas na literatura (L50S, S208T, N284H, V490L) para isolados com algum grau de resistência à DMI's e três com diferentes alterações, mas nas mesmas posições de aminoácidos descritos na literatura (V136A, A379G, e N513K para *M. graminicola*; V136I, A379S, e N513T para *P. oryzae* de trigo) (Tabela 4).

Finalmente, tivemos acesso a sequências do parálogo *B* do *cyp51* de sete isolados de *P. oryzae* de trigo (dados não publicados; Croll, D., ETH Zurich) também usados em nosso estudo, todos pertencentes ao H1 do *cyp51A*. Essas sequências foram comparadas com a referência de *cyp51B* de *P. oryzae* de trigo BR32 (86) e não foram encontradas quaisquer mutações neste parálogo que discriminasse os isolados em diferentes haplotipos.

Tabela 4- Mutações entre as sequências de *cyp51* de *Mycosphaerella graminicola* em resíduos correspondentes de *Pyricularia oryzae* de trigo de acordo com Leroux et al. (2007) e Stamler & Semar (2011). Média de EC₅₀ para os fungicidas tebuconazol e epoxiconazol estão apresentados para *M. graminicola*. A tabela mostra as variações encontradas entre os 180 isolados nesse estudo, sua classificação em 8 haplotipos, a média de EC₅₀ obtida para cada haplotipo em cada fungicida

Tebuconazol EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Epoxiconazol EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	<i>M. graminicola</i> ^a	50	136	379	513	208	284	490
		<i>P. oryzae</i> trigo (<i>cyp51A</i>) ^b	40	125	366	487	195	278	464
		Descrição mutação Fenótipo (S ou R)	L50S ^c S e/ou R	V136A/C/G ^c R	A379G ^c R	N513K ^c S e/ou R	S208T ^d R	N284H ^d R	V490L ^d R
0,011	0,002	<i>M. graminicola</i> Tri S	Ser	Val	Ala	Asn	Ser	Asn	Val
0,085	0,0055	<i>M. graminicola</i> Tri R2	Ser	Val	Ala	Asn	-	-	-
0,15	0,027	<i>M. graminicola</i> Tri R3	Leu	Val	Ala	Asn	-	-	-
0,23	0,012	<i>M. graminicola</i> Tri R4	Ser	Val	Ala	Lis	-	-	-
0,02	0,017	<i>M. graminicola</i> Tri R5	Leu	Ala	Ala	nd	-	-	-
0,82	0,051	<i>M. graminicola</i> Tri R6	Ser	Val	Ala	Asn	-	-	-
0,91	0,038	<i>M. graminicola</i> Tri R7	Ser	Val	Gli	Lis	-	-	-
1,08 (0,67 - 1,24)	0,63 (0,50 - 0,9)	H1	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
1,07	0,63	H2	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
1,03 (0,94 - 1,13)	0,63 (0,51 - 0,77)	H3	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
1,10 (1,05 - 1,15)	0,61 (0,56 - 0,76)	H4	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
1,12	0,63	H5	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
1,15	0,63	H6	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
1,10	0,94	H7	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
1,00	0,94	H8	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
Nd	Nd	P131 ^f	Ser	Ile	Ser	Tre	Tre	His	Leu
Nd	Nd	70-15 ^f	Ser	Ille	Ser	Tre	Tre	His	Leu

^a posição referente ao resíduo de aa de *M. graminicola* Tri S (EF418622)

^b posição correspondente ao resíduo de aa em *P. oryzae* de trigo

^c descritas por Leroux et al. 2007 e d descritas por Stamler & Semar, 2011

^e inclui sequência do gene *cyp51* do isolado BR32 de *P. oryzae* do trigo

^f sequências de dois isolados de *P. oryzae* de arroz

() referente a amplitude do valor de EC₅₀ que originou a média

S ou R – indicam sensível ou resistente, nd – não determinado

5 DISCUSSÃO

5.1 A DISTRIBUIÇÃO GENERALIZADA DA RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS TRIAZÓIS NO PAÍS

São escassos os relatos de resistência a fungicidas em populações de fitopatógenos nos agroecossistemas brasileiros, especialmente no patossistema trigo - brusone. Assim, este estudo teve como objetivo determinar as distribuições de frequência da sensibilidade de populações de *Pyricularia oryzae* do trigo amostradas no Centro-Sul do Brasil, com base nos valores de EC_{50} a tebuconazol e epoxiconazol. Avaliamos, também, se a presença de mutações no gene *cyp51A* do *P. oryzae* do trigo estão correlacionadas com a resistência a fungicidas DMI's. Esse foi, possivelmente, o primeiro estudo que relatou a ocorrência de resistência a triazóis em *P. oryzae* do trigo no país.

Especificamente para patógenos do trigo, há relatos de resistência de *Puccinia triticina*, agente causal da ferrugem da folha, a triazóis (94), de *Blumeria graminis tritici*, agente do oídio, ao triadimenol (95) e a redução da sensibilidade às estrobilurinas em *Drechslera siccanse*, *D. tritici-repentis*, agentes causais da mancha-amarela-da-folha do trigo. (96) Recentemente, nosso grupo de pesquisa (14, 97) relatou a distribuição generalizada da resistência a azoxistrobina e a resistência cruzada a piraclostrobina em populações de *P. oryzae* amostradas nos mesmos campos brasileiros de trigo e de outras poáceas hospedeiras amostradas para este estudo.

A primeira observação importante de nosso estudo é a predominância da resistência de *P. oryzae* a dois fungicidas triazóis (tebuconazol e epoxiconazol) intensamente usados para o manejo de doenças do trigo no Brasil. (98, 99) Embora em níveis variáveis, a resistência a tebuconazol e epoxiconazol foi detectada do Centro-Oeste ao Sul do Brasil, nos estados de DF/GO, MG, MS, SP, PR e RS.

Como não dispúnhamos de isolados de *P. oryzae* que fossem padrões de sensibilidade comparamos, então, com dados detalhados publicados para o fungo *M. graminicola* do trigo. Para *M. graminicola*, valores de EC_{50} de 0,011 e 0,002 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para tebuconazol e epoxiconazol, respectivamente, foram considerados como padrão de sensibilidade para esse fitopatógeno. (68) Tais valores de EC_{50} para os isolados de *M. graminicola* sensíveis a fungicidas DMI's são cerca de 61 e 251 vezes

menores que os encontrados para os isolados de *P. oryzae* de trigo. Quando em comparação com isolados de *M. graminicola* resistentes a DMIs (cuja EC_{50} média foi de $0,369 \mu\text{g mL}^{-1}$ para tebuconazol e de $0,0251 \mu\text{g mL}^{-1}$ para epoxiconazol), os isolados de *P. oryzae* foram cerca de cerca de 3 a 35 vezes menos sensíveis.

Usando como base as doses recomendadas para aplicação de fungicidas triazóis em campos de trigo no Brasil, 45 g i.a./ha para epoxiconazol e 150 g i.a./ha para tebuconazol, respectivamente, e levando em consideração a altura média de uma planta de trigo em fase inicial de espigamento, cerca de 0,82 m, determinou-se que as concentrações aplicadas em áreas cultivadas com trigo são de $0,0055 \mu\text{g mL}^{-1}$ para epoxiconazol e de $0,0180 \mu\text{g mL}^{-1}$ para tebuconazol. Comparando-se os valores aplicados no campo com os valores médios de EC_{50} obtidos em nosso estudo, constatou-se que os isolados de *P. oryzae* do trigo toleram concentrações de tebuconazol de cerca de 35 a 70 e de epoxiconazol entre 91 a 161 vezes maiores do que a dose recomendada para uso no campo.

Esses 180 isolados avaliados em nosso estudo, também foram anteriormente testados quanto à resistência a estrobirulina. (14) Um total de aproximadamente 89% (N = 160) destes isolados apresentaram o alelo *cytb* para resistência a estrobirulinas e foram caracterizados como insensíveis a azoxistrobina, além de insensíveis a tebuconazol e a epoxiconazol. A detecção de resistência a múltiplos fungicidas em *P. oryzae* do trigo é uma informação relevante que possivelmente explica o motivo da ineficácia em se manejar a brusone do trigo com fungicidas estrobirulinas e triazóis no campo.

Os dados obtidos corroboram com os relatos de baixa eficiência de diferentes fungicidas no manejo da brusone de trigo (22, 100), mas especialmente triazóis e estrobirulinas. (98, 9, 99) Santana, Maciel (98) avaliaram a eficácia de fungicidas do grupo químico triazol, isoladamente ou em mistura com fungicidas do grupo das estrobirulinas e constataram que, apesar da redução da incidência da doença, o nível de controle não foi suficiente para manter rendimentos compatíveis com a média de rendimento da cultura no Brasil. De maneira similar, Rocha, Pimentel (99) observaram que apesar de resultados mais satisfatórios no controle da brusone quando utilizou-se misturas, estrobirulina com triazol, os fungicidas não foram capazes de controlar a brusone em espigas, que constitui o maior dano econômico da doença na cultura.

O mesmo foi observado por Pagani, Dianese (9) que relataram que embora o uso de fungicidas sintéticos, triazóis ou mistura de triazóis com estrobirulina, reduzisse a severidade da brusone em espigas de trigo, o controle não foi completo na cultivar suscetível BRS264 nas safras de 2010 e 2011 nos cerrados do DF (cerca de 40% de redução da incidência e 55% de redução da severidade). A aplicação de fosfito de potássio (K_2HPO_3) como controle alternativo proporcionou efeito semelhante ao uso de fungicidas sintéticos.

Considerando-se este cenário de ineficácia de fungicidas no manejo da brusone, há plena concordância sobre a necessidade emergencial de cultivares de trigo resistentes à doença. (98, 9, 99) Entretanto, é de conhecimento que o patógeno tem alto potencial evolutivo em função de apresentar sistema reprodutivo misto, alta variabilidade genética e patotípica e fluxo gênico a longas distâncias, o que contribui, também, para a inconsistência e a baixa durabilidade da resistência de cultivares de trigo a brusone no país. (101, 102, 25)

5.2 MUTAÇÕES PONTUAIS, EVOLUÇÃO DO GENE *CYP51A* DE *P. oryzae* DO TRIGO E A ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA A TRIAZÓIS

Um dos principais mecanismos que atuam na resistência aos fungicidas DMI's são as mutações pontuais no parálogo A do gene *cyp51*. (17) Essa associação de que o *cyp51A* desempenha papel fundamental ligado a resistência aos azólicos, à conidiogênese e à virulência, foi descrita para *Fusarium graminearum* (76), *Rhynchosporium commune*, o agente causal da escaldadura da cevada (80) e especialmente para *P. oryzae* do arroz (75), razão pela qual escolheu-se a análise de mutações no *cyp51A* de *P. oryzae* do trigo. Por sua vez, o nocaute do *cyp51B* não esteve envolvido na mediação da resistência à triazóis. (75)

O único artigo que descreve a associação de duas mutações com maior ou menor sensibilidade a triazóis em *P. oryzae* comparou 52 isolados de arroz na China, mas acredita-se que os autores utilizaram o parálogo B do *cyp51*. (103) Além de não se indicarem a que parálogo se referiam, essas sequências não foram depositadas no GenBank.

Como não há relatos da associação de mutações do gene *cyp51A* em *P. oryzae* de trigo com a resistência a triazóis, decidiu-se por comparar com as mutações

detectadas para o fitopatógeno *M.graminicola*, para o qual há abundância de estudos. Foram observadas em *P. oryzae* do trigo as mutações não-sinônimas L50S, S208T, N284H, V490L, assim como as relatadas por Cools, Bayon (104). A mutação L50S em particular, identificada no gene *cyp51A* de variantes modernas de *M. graminicola* tanto sensíveis quanto resistentes, parece não ter um efeito claro sobre a resistência. (68, 87) Já as mutações S208T, N284H e V490L foram identificadas em isolados resistentes, em combinação com outras alterações. (88) Ainda foram encontradas outras alterações nas posições V136I, A379S e N513T em *P. oryzae* do trigo (tabela 4), que podem estar associada com resistência a DMIs.

Além das mutações pontuais no sítio alvo, é provável que a resistência detectada em *P. oryzae* do trigo possa ser mediada por outros mecanismos, que incluem a super expressão do gene *cyp51A* (105, 65, 53, 106, 57) e aumento do efluxo de transportadores ABC (59, 107, 70, 108, 109, 110, 69, 104). Dessa forma, seria importante, também, a investigação de outros mecanismos envolvidos na resistência a fungicidas DMI em *P. oryzae* do trigo.

Em comparação com outros fungicidas sítio-específicos que se tornam ineficazes devido à pressão de seleção por mutações pontuais nos genes que codificam para as proteínas alvo, postula-se que a eficácia de DMI's diminuiu de forma relativamente lenta e gradual (111), dado ao caráter poligênico e quantitativo da resistência aos fungicidas triazóis. (20) Para esses fungicidas, o desenvolvimento da resistência não leva à completa e imediata perda do controle da doença e é frequentemente descrito como mudança gradual na sensibilidade aos princípios ativos dada à pressão de seleção contínua pelo uso de fungicidas. (112) A inexistência de populações históricas correspondentes, amostradas em anos anteriores, não nos possibilitou detectar a evolução gradual da resistência aos DMI's testados. Entretanto, foi evidente o caráter quantitativo da variação fenotípica contínua da resistência a tebuconazol e epoxiconazol exibido pelos isolados de *P. oryzae* dentro de cada uma das seis populações amostradas (figura 3). Por sua vez, os altos níveis atuais de resistência aos fungicidas DMI's detectados nas populações de *P. oryzae* devem ser resultado do uso contínuo e intensivo de triazóis em lavouras de trigo do Brasil nas últimas três décadas. O primeiro relato de uso intensivo de um fungicida triazól, o triadimenol, na cultura do trigo, no Brasil, é de 1979 (113). A partir da safra de 1986

foi lançado o fungicida propiconazol no mercado brasileiro (114). Mais tarde, na safra 1991, foi recomendado o uso de tebuconazol (115), na safra de 1993 o ciproconazol (116) e na safra de 2000 (117) o epoxiconazol.

Os dados fenotípicos e as mutações no *cyp51A* descritas em nosso estudo apontam para a ampla distribuição da resistência das populações de *P. oryzae* à triazóis nas áreas tritícolas importantes do Centro-Sul do Brasil. Esse é um dado alarmante, considerando que a maioria desses isolados também são resistentes a estrobirulinas. Particularmente para o grupo de fungicidas triazóis, amplamente usados para manejo das ferrugens (118, 119, 120, 13), teria sido mais adequado a adoção de estratégias anti-emergência, como a co-formulação com fungicidas protetores, multi-sítios e de amplo-espectro de ação (121). A resistência quantitativa aos triazóis é considerada parcialmente reversível (122, 123), i.e., há custo adaptativo negativo para os isolados resistentes a triazóis, o que implica em não utilizar esses fungicidas por algum tempo e substituir cultivares suscetíveis para que os isolados resistentes sejam menos aptos em sobreviver do que os selvagens sensíveis. (124) Esse cenário aparentemente não é possível a curto e médio prazo, uma vez que o controle químico ainda é a principal alternativa utilizada no manejo de outras doenças da cultura, especialmente pela disponibilidade limitada de cultivares resistentes e adaptadas às distintas condições de cultivo de trigo no Brasil. Porém, na eventualidade de que outros princípios ativos, ou outros triazóis possam ser eficazes no manejo da brusone, utilizar apenas co-formulações com fungicidas protetores e de múltiplos sítios de ação. (31, 125)

Finalmente, ao analisarmos a distribuição geográfica e as relações evolutivas entre os alelos do gene *cyp51A*, observamos a predominância do haplotipo H1, (N = 171), correspondente a 95% do isolados analisados em todas as populações amostradas. No MS foi detectado apenas o haplotipo H1. Os demais haplotipos foram detectadas em baixa frequência: em MG detectou-se o haplotipo H2, em SP o haplotipos H3, no RS os haplotipos H7 e H8 e no DF/GO os haplotipos H4, H5 e H6, com frequência N = 2, N=1, N=1, respectivamente. A sequência do gene *cyp51* do isolado BR32 de *P. oryzae* de trigo foi também adicionado na análise e correspondeu ao H1. (Figura 4).

A predominância do haplotipo H1 poderia estar relacionado a alguma vantagem adaptativa dos isolados. A primeira hipótese que levantamos foi de que esses isolados carregam também o alelo do *cytb* para resistência a estrobirulinas e portanto teriam vantagem adaptativa da dupla resistência a fungicidas. De fato, dentro do haplotipo H1, 88% do total de isolados (N = 151) foram caracterizados como resistentes a estrobirulinas e carregam o alelo *cytb* que confere resistência. (14) Entretanto, todos os demais haplotipos identificados (de H2 a H8) são *cytb* resistentes, enquanto que 12% do total de isolados do haplotipo H1 (N =20) foram sensíveis à estrobirulinas, o que contradiz nossa hipótese. Uma outra justificativa possível para a predominância do haplotipo H1 poderia ser a vantagem adaptativa pela seleção imposta pelo cultivo de genótipos de trigo mais suscetíveis a esses isolados. Entretanto, não há, até o momento, informação sobre quantos grupos de virulência compõem a população de isolados do haplotipo H1 para dar suporte a esta hipótese.

Embora o tópico sobre relação e a distinção filogenética entre populações de *P. oryzae* do arroz e do trigo fuja ao escopo de nossa pesquisa, um fato intrigante obtido nesse trabalho é a observação das mutações presentes no gene *cyp51A* do haplotipo 8 (isolado 121229) que possui oito passos mutacionais em relação à referência (H1) e está mais próximo do isolado de arroz (P131) do que da sequência referência de um isolado do trigo BR32 (Figura 4). Ainda, das treze mutações que diferenciam o *cyp51A* de *P. oryzae* de arroz (70-15) e *P. oryzae* do trigo (BR32), as oito observadas no H8 são compartilhadas com a sequência referência de *P. oryzae* do arroz (70-15). Esses dados apontam para uma proximidade filogenética do haplotipo H8 isolado de trigo com *P. oryzae* do arroz. De fato, baseado em dados de patogenicidade, há evidência da existência de dois grupos distintos de *P. oryzae* causando a brusone do trigo no Brasil, sendo que um infecta arroz e outro não. (126)

6 CONCLUSÃO

As populações de *P. oryzae* estudadas são insensíveis aos fungicidas triazóis tebuconazol e epoxiconazol.

Sete mutações não sinônimas encontradas no gene *cyp51A* podem estar correlacionadas com a resistência aos DMIs em populações de *P. oryzae* do trigo.

REFERÊNCIAS

- 1 OU, S. H. **Blast**: in rice diseases. Wallingford: S.H. ou- Editor, 1985. p. 109-201. CAB International.
- 2 PRABHU, A. S. et al. Estimativa de danos causados pela brusone na produtividade de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1045-1051, 2003.
- 3 GOULART, A. C. P.; SOUSA, P. G.; URASHIMA, A. S. Damages in wheat caused by infection of *Pyricularia grisea*. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 358-363, 2007.
- 4 DEAN, R. et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, n. 4, p. 414-30, 2012.
- 5 IGARASHI, S. et al. *Pyricularia* em trigo. 1. ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 351-352, 1986.
- 6 DUVEILLER, E.; HODSON, D.; TIEDEMANN, A. V. Wheat blast caused by magnaporthe grisea: a reality and new challenge for wheat research. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 8., 2010, St. Petersburg. **Abstracts...** St. Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry, 2010, p. 247-248.
- 7 LIMA, M. I. P. M.; MINELLA, E. Occurrence of head blast in barley. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 207, 2003.
- 8 MACIEL, J. L. N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Oxfordshire, v. 6, n. 50, p. 1-28, 2011.
- 9 PAGANI, A. P. S.; DIANESE, A. C.; CAFÉ-FILHO, A. C. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 42, n. 5, p. 609-617, 2014.
- 10 MAPA AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. [S.l.: s.n., 200-]. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 fev. 2016.
- 11 NAVARINI, L.; BALARDIN, R. S. Doenças foliares e o controle por fungicidas na produtividade e qualidade de grãos de trigo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 4, p. 294-299, 2012.
- 12 TORMEN, N. et al. Reação de cultivares de trigo à ferrugem da folha e mancha amarela e responsividade a fungicidas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 239-246, 2013.

- 13 DEBONA, D. et al. Controle químico da ferrugem da folha em cultivares de trigo submetidas a diferentes níveis de adubação nitrogenada. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 16, n. 1, p. 52-65, 2009.
- 14 CASTROAGUDIN, V. L. et al. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, n. 3, p. 284-94, 2015.
- 15 YANG, J. et al. Expression and homology modelling of sterol 14 α -demethylase of *Magnaporthe grisea* and its interaction with azoles. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, n. 3, p. 260-265, 2009.
- 16 ZHAN, J.; STEFANATO, F. L.; MCDONALD, B. A. Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host resistance. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n. 4, p. 259-268, 2006.
- 17 TALAS, F.; MCDONALD, B. A. Significant variation in sensitivity to a DMI fungicide in field populations of *Fusarium graminearum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 664-670, 2015.
- 18 BRUNNER, P. C.; STEFANATO, F. L.; MCDONALD, B.A. Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 3, p. 305-16, 2008.
- 19 CHÁVEZ, T. et al. **Análisis genético de la resistencia a triazoles em aislados de *Mycosphaerella fijiensis* para poblaciones de Ecuador.** [S.l.: s.n.], 2012. Disponível em: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/24639/1/CIBE_An%C3%A1lisis%20genetico%20de%20la%20resistencia%20a%20triazoles.pdf> Acesso em: 15 dez 2015.
- 20 GISI, U. et al. Sensitivity profiles of *Mycosphaerella graminicola* and *Phytophthora infestans* populations to different classes of fungicides. **Pesticide Science**, Kita-ku, v. 51, n. 3, p. 290–298, 1997.
- 21 FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE'S - FRAC. **Pathogen risk list (updated December 2013).** [S.l.: s.n., 200-]. Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=8>>. Acesso em: 29 jan. 2016.
- 22 GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. D. A. Sobrevivência de *Pyricularia oryzae* Cav. em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) armazenadas em diferentes ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 15, n. 2, p. 153-156, 1993.
- 23 GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A.; ANDRADE, P. J. M. Qualidade sanitária de sementes de trigo produzidos no Mato Grosso do Sul, safras 1987 a 1992. **Summa phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 3-4, p. 235-238, 1995.

- 24 URASHIMA, A. S.; LEITE, S. F.; GALBIERI, R. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. **Summa phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 3, p. 275-279, 2007.
- 25 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**, Saint Paul, v. 104, n. 1, p. 95-107, 2014.
- 26 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**, Saint Paul, v. 104, n. 1, p. 95-107, 2013.
- 27 KLAUBAUF, S. et al. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (*Pyriculariaceae*). *Studies in Mycology*, Amsterdam, v. 79, p. 85-120, 2014.
- 28 TOSA, Y.; CHUMA, I. Classification and parasitic specialization of blast fungi. **Journal of General Plant Pathology**, Japan, v. 80, n. 3, p. 202-209, 2014.
- 29 HAWKSWORTH, D. L. et al. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. **IMA Fungus**, Ashtead, v. 2, n.1, p. 105-12, 2011.
- 30 COUCH, B. C.; L.M. KOHN, A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *magnaporthe oryzae*, from *m. grisea*. **Mycologia**, Lawrence, v. 94, n. 4, p. 683-693, 2002.
- 31 URASHIMA, A. S.; KATO, H. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. **Summa phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, n. 2, p. 107-112, 1994.
- 32 MEHTA, Y. R. **Doenças do trigo e seu controle**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. v. 20, p. 190.
- 33 URASHIMA, A. S. Blast. In: BOCKUS, W. W; BOWDWN, R. L. ; HUNGER, R. M; MORRIL, W. L.; MURRAY, T. D. ; SMILEY, R. W. (Org.). **Compendium of wheat diseases and pests**. 3. ed. St. Paul. American Phytopathological Society, 2010. p. 22-23.
- 34 GOULART, A.C.P.; PAIVA, F. A. Perdas no rendimento de grãos de trigo causada por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. **Summa phytopathologica**, Piracicaba, v. 26, p. 279-282, 2000.
- 35 PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. **Doenças de cereais de inverno: aspectos epidemiológicos e controle**. Passo Fundo: CNPT/EMBRAPA, 1995. p. 58.
- 36 GOULART, A.C.P.; PAIVA, F. D. A.; STAUT, L. A. Reação de cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) à brusone (*Pyricularia oryzae* Cav) em condições de campo. In: COMISSÃO CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 8., 1992, Londrina. **Reunião...** Dourados: Embrapa-Uepae, 1992. p. 169-171.

- 37 URASHIMA, A. S.; IGARASHI, S.; KATO, H. Host range, mating type, and fertility of *pyricularia grisea* from wheat in Brazil. **Plant disease**, Saint Paul, v. 77, p. 1211-1216, 1993.
- 38 URASHIMA, A. S.; KATO, H. Pathogenic relationship between isolates of *Pyricularia grisea* of wheat and other hosts at different host developmental stages. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 30-35.
- 39 TAKABAYASHI, N. et al. A gene-for-gene relationship underlying the species-specific parasitism of avena/triticum isolates of *Magnaporthe grisea* on wheat cultivars. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 11, p. 1182-1188.
- 40 MURAKAMI, J. et al. Analysis of host species specificity of *Magnaporthe grisea* toward foxtail millet using a genetic cross between isolates from wheat and foxtail millet. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 42-45, , 2003.
- 41 COUCH, B. C. et al. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, Bethesda, v. 170, n. 2, p. 613-630.
- 42 BRUNO, A. C.; URASHIMA, A. S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo e de outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 21-26, 2001.
- 43 PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p. 387.
- 44 HEATH, M. C. et al. Correlations between cytologically detected plant-fungal interactions and pathogenicity of *Magnaporthe grisea* toward weeping lovegrass. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 1382-1386, 1990.
- 45 MENTEN, J. O. M.; MORAES, M. H. D. Importância da semente na disseminação de *Pyricularia* sp. na cultura do trigo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 14, n. 1-2, p. 53. (Resumo).
- 46 TANAKA, M. A. S.; ALVES, M.L.B.; MENTEN, J. O. M. *Pyricularia* spp. de trigo e arroz: II – transmissão através de sementes inoculadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 106, 1988. (Resumo).
- 47 GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A.; MESQUITA, N. A. Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*) em Mato Grosso do Sul. **Fitopatologia brasileira**, Piracicaba, v. 15, n.1, p. 112-114, 1990.
- 48 IGARASHI, S. Análise da ocorrência de brusone do trigo no Paraná. – In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO- RENAPET, 15., 1988, Passo Fundo. **REUNIÃO...** Passo Fundo: CNPT/EMBRAPA , 1988. p. 19.

- 49 GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A. Controle de *Pyricularia oryzae* e *Helminthosporium sativum* pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11-12, p. 1983-1988.
- 50 URASHIMA, A. S. et al. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n.5, p. 511-518, 2004.
- 51 PANISSON, E.; BOLLER, W.; REIS, E. M. Avaliação da deposição de calda em anteras de trigo, para o estudo do controle químico de Giberela (*Gibberella zeae*). **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 24, p. 111-120, 2004.
- 52 CRUZ, M. F. A. et al. Aplicação foliar de produtos na redução da severidade da brusone do trigo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, p. 424-428.
- 53 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.
- 54 PROFFER, T. J. et al. Occurrence, distribution, and polymerase chain reaction-based detection of resistance to sterol demethylation inhibitor fungicides in populations of *Blumeriella jaapii* in michigan. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 7, p. 709-717, 2006.
- 55 DELYE, C.; CORIO-COSTET, M. F. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*. RAPD analysis discriminates two biotypes. **Mycological Research**, Saint Paul, v. 102, n. 3, p. 283-288, 1998.
- 56 WYAND, R. A.; BROWN, J. K. M. Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, n. 8, p. 726-735, 2005.
- 57 LUO, C. X.; SCHNABEL, G. The cytochrome P450 Lanosterol 14 α -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 359-366, 2008.
- 58 BEAN, T. P. et al. Sterol content analysis suggests altered eburicol 14 α -demethylase (CYP51) activity in isolates of *Mycosphaerella graminicola* adapted to azole fungicides. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 296, n. 2, p. 266-273, 2009.
- 59 NAKAUNE, R. et al. A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3983-3988, 1998.

- 60 HAMAMOTO, H. et al. PCR-based detection of sterol demethylation inhibitor-resistant strains of *Penicillium digitatum*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, n. 9, p. 839-843, 2001.
- 61 ZHAO, L. et al. Expression and homology modeling of sterol 14 α -demethylase from *Penicillium digitatum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 277, p. 37-43, 2007.
- 62 WOOD, H. M. et al. Cloning of the CYP51 gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 196, p. 183–187, 2001.
- 63 TOSA, Y.; TADA, S. Operation of resistance genes in wheat to *Erysiphe graminis f.sp. tritici* against *E. graminis f.sp. agropyri*. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 33, p. 231-234, 1990.
- 64 DELYE, C.; LAIGRET, F.; CORIO-COSTET, M. F. RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 670-677, 1997.
- 65 SCHNABEL, G.; JONES, A. The 14 α -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in venturia inaequalis strains resistant to myclobutanil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 102–110, 2001.
- 66 YIN, Y. et al. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of fusarium asiaticum and f. graminearum collected from wheat in China. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 487-497.
- 67 GALBIERI, R.; URASHIMA, A.S.I. Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual entre isolados de pyricularia grisea de diferentes hospedeiros. **Summa phytopathologica**, Jaguariúna, v. 34, p. 22-28, 2008.
- 68 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**, Sussex, v. 63, n. 7, p. 688-698, 2007.
- 69 LEROUX, P.; WALKER, A. S. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of mycosphaerella graminicola. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, p. 44–59, 2011.
- 70 STERGIOPOULOS, I. et al. Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of mycosphaerella graminicola. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, p. 1333–1343, 2003.

- 71 FORCELINI, C. A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I. triazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 335-355, 1994.
- 72 TOMLIN, C. D. S. **The pesticide manual: a world compendium**. 12. ed. Surrey: British. Crop Protection Guildford, Inglaterra, 2002. 1CD-ROM.
- 73 HAWKINS, N. J. et al. Paralog re-emergence: a novel, historically contingent mechanism in the evolution of antimicrobial resistance. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 31, n. 7, p. 1793-802, 2014.
- 74 MELLADO, E. et al. Targeted gene disruption of the 14-alpha sterol demethylase (cyp51A) in aspergillus fumigatus and its role in azole drug susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2536-2538, 2005.
- 75 YAN, X. et al. A sterol 14 α -demethylase is required for conidiation, virulence and for mediating sensitivity to sterol demethylation inhibitors by the rice blast fungus magnaporthe oryzae. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 2, p. 144-153, 2011.
- 76 FAN, J. et al. Characterization of the sterol 14alpha-demethylases of fusarium graminearum identifies a novel genus-specific CYP51 function. **New Phytologist**, Cambridge, v. 198, n. 3, p. 821-35.
- 77 BECHER, R.; WIRSEL, S.G. Fungal cytochrome P450 sterol 14alpha-demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 95, n. 4, p. 825-40, 2012.
- 78 MELLADO, E. et al. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (cyp51A and cyp51B) in aspergillus fumigatus and other aspergillus species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 7, p. 2431-2438, 2001.
- 79 SUN, X. et al. PdCYP51B, a new putative sterol 14alpha-demethylase gene of penicillium digitatum involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 91, n. 4, p. 1107-1119, 2011.
- 80 BRUNNER, P. C. et al. A global analysis of CYP51 diversity and azole sensitivity in Rhynchosporium commune. **Phytopathology**, Saint Paul, 2015. [Epub ahead of print].
- 81 LIU, X. et al. Gene transcription profiling of fusarium graminearum treated with an azole fungicide tebuconazole. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1105-1114, 2010.
- 82 DEAN, R. A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus magnaporthe grisea. **Nature**, Hamps, v. 434, n. 7036, p. 980-986, 2005.

- 83 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, n. 52, p. 52-70, 2014.
- 84 VARGAS, M. H. **ED50plus v1.0**. Mexico: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, p. 2000.
- 85 R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). **R**: A language and environment for statistical computing. Austria: [s.n., 200-]. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <URL <http://www.R-project.org/>>. Acesso em : 20 outubro 2015.
- 86 CHIAPELLO, H. et al. Deciphering genome content and evolutionary relationships of isolates from the fungus magnaporthe oryzae attacking different host plants. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 7, n. 10, p. 2896-28912, 2015.
- 87 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 and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 9, p. 2866-2872, 2010.
- 88 STAMMLER, G.; SEMAR, M. Sensitivity of mycosphaerella graminicola (anamorph: septoria tritici) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 41, n. 2, p. 149-155, 2011.
- 89 COOLS, H. J.; FRAAIJE, B. A. Update on mechanisms of azole resistance in mycosphaerella graminicola and implications for future control. **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, n. 2, p. 150-155, 2012.
- 90 ROZAS, J. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. **Molecular Biology**, Vavilova, v. 537, p. 337-350, 2009.
- 91 CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.
- 92 XUE, M. et al. Comparative analysis of the genomes of two field isolates of the rice blast fungus magnaporthe oryzae. **PLoS Genetics**, United States, v. 8, n. 8, p. e1002869, 2012.
- 93 LEUNG, H. et al. Genetic analysis of virulence in the blast fungus magnaporthe grisea. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1227-1233, 1988.
- 94 ARDUIM, F. S. et al. In vivo sensitivity reduction of *Puccinia triticina* races, causal agent of wheat leaf rust, to DMI and QoI fungicides. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 4, p. 306-311, 2012.
- 95 REIS, E. M.; BASSO, D. F.; ZANATTA, M. Loss of sensitivity of blumeria graminis f. sp. tritici to triadimenol applied as seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 55-57, 2013.

- 96 TONIN, R.F.B.; REIS, E. M.; DANELLI, A. L. D. Etiologia e quantificação dos agentes causais de manchas foliares na cultura do trigo nas safras 2008 a 2011. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 2, p. 102-109, 2013.
- 97 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**, Jaguariúna, v. 41, p. 298-304, 2015.
- 98 SANTANA, F. M. et al. **Eficiência de fungicidas para o controle da brusone do trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2011**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2013. p. 20. (Comunicado Técnico,328). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co328.htm>. Acesso em: 12 December 2015.
- 99 ROCHA, J. R. A. S. C. et al. Eficiência de fungicidas no controle da brusone em trigo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 4, p. 347-352, 2014.
- 100 URASHIMA, A. S. et al. Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homolog of retrotransposon MGR583. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 65, p. 429-436, 1999.
- 101 MACIEL, J. L. N. et al. **Reação à brusone de genótipos de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo no estágio de planta adulta**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. p. 14. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 64).
- 102 CRUZ, M. F. A. et al. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. 24-31, 2010.
- 103 FANG, M. et al. Sensitivity of magnaporthe grisea to the sterol demethylation inhibitor fungicide propiconazole. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 9, p. 568-572, 2009.
- 104 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**, Sussex, v. 68, n. 7, p. 1034-1040, 2012.
- 105 WHITE, T.C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in candida albicans isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 41, n. 7, p. 1482-1487, 1997.
- 106 MELLADO, E. et al. A new aspergillus fumigatus resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51a alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 51, n. 6, p. 1897-1904, 2007.

- 107 ZWIERS, L. H. et al. ABC transporters and azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *mycosphaerella graminicola*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 12, p. 3900 - 3906, 2002.
- 108 AKINS, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *candida albicans*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 43, p. 285–318, 2005.
- 109 MICHAILIDES, M. Z. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 853–863, 2005.
- 110 KRETSCHMER, M. O et al. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *botrytis cinerea*. **PLoS Pathogens**, United States, v. 5, n. 12, p. e1000696, 2009.
- 111 BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee, 2007. p. 44.
Disponível em:< <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-2.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.
- 112 LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; B.A. FRAAIJE, B. A. Chapter two - the evolution of fungicide resistance. In: SIMA, S.; MICHAEL, G. G. (Ed.). **Advances in applied microbiology**, Washington: Academic , 2015. p. 29-92.
- 113 UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL- UFRGS. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 1978, Porto Alegre. **Ata...** Porto Alegre: UFRGS, 1978. p. 87.
- 114 INSTITUTO DE PESQUISAS AGRONÔMICAS - IPAGRO. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE TRIGO, 1985, Porto Alegre. **Ata...** Porto Alegre: IPAGRO, 1985. p. 82.
115. INSTITUTO DE PESQUISAS AGRONÔMICAS- IPAGRO. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE TRIGO, 22., 1990, Porto Alegre. **Ata...**Porto Alegre: IPAGRO, 1990. p. 134.
116. FUNDAÇÃO CENTRO DE EXPERIMENTAÇÃO E PESQUISA. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 24., 1992, Cruz das Almas. **Ata...** Cruz Alta: FUNDACEP-FECOTRIGO, 1992.
117. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 31., 1999, Passo Fundo. **Ata...** Passo Fundo: Comissão Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo, 1999. p. 131.
- 118 GODOY, C. V. et al. Eficiência do fungicida azoxistrobin no controle da ferrugem da folha e de manchas foliares do trigo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, n. 1, p. 258, 2000.

- 119 PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. Controle da ferrugem da folha e da mancha bronzeada da folha de trigo pelo uso de fungicidas em tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 100, 2001.
- 120 KUHNEM JUNIOR, P. R. et al. Desempenho de fungicidas no controle de doenças foliares em trigo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2009.
- 121 FERNANDES, J. M. C.; PICININI, E. C. **Controlando as doenças de trigo na hora certa**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. (Comunicado Técnico, 22). Disponível em: : <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co22.htm>. Acesso em: 20 dez. 2015.
- 122 PEEVER, T. L.; MILGROOM, M. G. Genetic correlations in resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, 1993, p. 1976-1082.
- 123 KUCK, K. H. Fungicide resistance management in a new regulatory environment. In: Dehne, H. W.; Gisi, U.; Kuck, K. H.; Russell, P. E.; Lyr, H. **Modern fungicides and antifungal compounds IV**. Germany: [s.n.], 2005, p. 35-43.
- 124 KUCK, K. H. DMI fungicides: 20 years of experience with resistance development and resistance management. In: DEHNE, H.W.; GISI, U.; KUCK, K. H.; RUSSELL, P. E.; LYR, H. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds III**, Gelsenkirchen: Verlag Th. Mann GmbH & Co. KG, 2002. p. 21-28.
- 125 GOULART, A. C. P. et al. Efeito da época e do número de aplicações dos fungicidas tebuconazole e mancozeb no controle da brusone (*Pyricularia grisea*) do trigo: viabilidade técnica e econômica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 381-387, 1996.
- 126 URASHIMA, A. S.; GALBIERI, R.; STABILI, A. DNA fingerprinting and sexual characterization revealed two distinct populations of *Magnaporthe grisea* in wheat blast from Brazil. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, Prague, v. 41, p. 238-245, 2005.