

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

FABIO GOMES ASSIS JUNIOR

**PODEM OS INIBIDORES DE BOMBA DE EFLUXO REVERTER O FENÓTIPO DE
RESISTÊNCIA MULTIDROGAS EM *Pyricularia oryzae*?**

Ilha Solteira
2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FABIO GOMES ASSIS JUNIOR

**PODEM OS INIBIDORES DE BOMBA DE EFLUXO REVERTER O FENÓTIPO DE
RESISTÊNCIA MULTIDROGAS EM *Pyricularia oryzae*?**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Unesp como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini
Orientador

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvida pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

- A848p Assis Junior, Fabio Gomes.
Podem os inibidores de bomba de efluxo reverter o fenótipo de resistência multidrogas em *Pyricularia oryzae*? / Fabio Gomes Assis Junior. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
43 f.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2023
- Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Inclui bibliografia
1. Brusone do trigo. 2. DMI. 3. SDHI. 4. Cloridrato de verapamil. 5. Reversão de resistência.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PODEM OS INIBIDORES DE BOMBA DE EFLUXO REVERTER O FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA MULTIDROGAS EM PYRICULARIA ORYZAE?

AUTOR: FABIO GOMES ASSIS JUNIOR

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, especialidade: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI (Participação Presencial)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Profa. Dra. ANA CAROLINA FIRMINO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - UNESP

Dra. TATIANE CARLA SILVA (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo - USP

Ilha Solteira, 21 de agosto de 2023

RESUMO

A linhagem *Triticum* de *Pyriricularia oryzae* (*PoTl*) é um importante patógeno da cultura do trigo, apresentando níveis de resistência a diversos fungicidas registrados para a cultura, como Qols e DMIs. Pesquisas conduzidas com populações deste ascomiceto amostradas nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil nos anos de 2012 e 2018 elucidaram características importantes quanto ao mecanismo de resistência em *PoTl*, como a baixa ou nula participação das substituições sinônimas e não-sinônimas nos genes que expressam os sítios-alvo dos fungicidas e respostas a substratos de transportadores membranares, fortalecendo a hipótese de um mecanismo pré existente e inespecífico de resistência, dentre os quais destacam-se as bombas de efluxo. Desta forma, submetemos 14 isolados de *PoTl* a testes de reversão do fenótipo de resistência utilizando o inibidor de bombas de efluxo do tipo *ATP-Binding Cassette*, cloridrato de verapamil (VER), associando-o a dois fungicidas com modos de ação distintos. A maior limitação para o uso do VER como inibidor é a baixa tolerância deste patógeno à concentrações superiores a 1 mg.mL⁻¹, para as quais a atividade metabólica decresce drasticamente. Embora existam indícios da contribuição das bombas de efluxo na resistência a fungicidas em *PoTl*, a utilização de VER não foi definitivamente capaz de reverter os fenótipos de resistência encontrados. Esta constatação destaca a complexidade dos desafios na reversão da resistência em *PoTl* e a necessidade de explorar alternativas eficazes para enfrentar essa questão.

Palavras-chave: brusone do trigo; DMI; SDHI; cloridrato de verapamil; reversão de resistência.

ABSTRACT

The Triticum lineage of *Pyricularia oryzae* (*PoTI*) is a significant pathogen of wheat crops, exhibiting levels of resistance to various registered fungicides for the crop in Brazil, such as QoIs and DMIs. Research conducted on populations of this ascomycete sampled in the Central-West, Southeast, and South regions of Brazil in the years 2012 and 2018 revealed important characteristics regarding the resistance mechanism in *PoTI*. This includes the low or null involvement of synonymous and non-synonymous substitutions in genes that express the fungicides' target sites, as well as responses to substrates of membrane transporters, reinforcing the hypothesis of a pre-existing and nonspecific resistance mechanism, among which efflux pumps stand out. Accordingly, we subjected 14 isolates of *PoTI* to resistance phenotype reversion tests using the ATP-Binding Cassette-type efflux pump inhibitor, verapamil hydrochloride (VER), in combination with two fungicides with distinct modes of action. The major limitation for using VER as an inhibitor is the low tolerance of this pathogen to concentrations exceeding 1 mg.mL⁻¹, at which metabolic activity drastically decreases. Despite strong indications of efflux pumps' contribution to fungicide resistance in *PoTI*, ultimately VER was not capable of reverting resistance phenotypes found. This finding underscores the complexity of challenges in reversing resistance in *PoTI* and the need to explore effective alternatives to address this issue.

Keywords: wheat blast; DMI; SDHI; verapamil hydrochloride; resistance reversal.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Determinação da DMT do cloridrato de verapamil por análise conjunta de variância no crescimento de quatro isolados de *P. oryzae*, dois da linhagem *Triticum* e dois da linhagem *Oryza*..... 24
- Figura 2** - Comparação de médias para os tratamentos com VER, TBC e VER+TBC em 14 isolados de *P. oryzae*..... 28
- Figura 3** - Comparação de médias para os tratamentos com VER, FLX e VER+FLX em 14 isolados de *P. oryzae*..... 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Nomenclatura dos isolados, espécies, local, ano de amostragem populacional e fenótipos de resistência previamente identificados.....	20
Tabela 2	- Isolados utilizados e doses testadas para DMT de VER.....	22
Tabela 3	- Representação esquemática da distribuição dos tratamentos por isolado.....	22
Tabela 4	- Análise de variância do efeito dos tratamentos com VER, FLX, TBC, suas combinações sobre os isolados e perfis de sensibilidade observado.....	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
CHX	Cicloheximidina
CR	Crescimento relativo
DMI	Inibidor da esterol-14-demetilase
DMT	Dose máxima tolerada
EC ₅₀	Concentração efetiva 50
FLC	Fluconazol
FLX	Fluxapiroxade
MDR	Resistência multidrogas (<i>multidrug resistance</i>)
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MID	Dose mínima inibitória (<i>minimum inhibitory dose</i>)
PD	Dextrose de batata (<i>potato dextrose</i>)
<i>PoTI</i>	Linhagem <i>Triticum</i> de <i>Pyricularia oryzae</i>
QoI	Inibidor de quinona
Rh123	Rodamina 123
RH6G	Rodamina 6G
RZ	Resazurina
SDHI	Inibidor da succinato desidrogenase
TBC	Tebuconazol
TOL	Tolftanato
TPCL	Cloreto de trifenilestanho
VER	Cloridrato de verapamil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	DESCRIÇÃO DO PATÓGENO.....	15
2.2	DESCRIÇÃO DA DOENÇA.....	15
2.3	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E A LINHAGEM <i>Triticum</i> DE <i>Pyricularia oryzae</i>	16
2.4	BOMBAS DE EFLUXO COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA MULTIDROGAS.....	17
2.5	CLORIDRATO DE VERAPAMIL COMO INIBIDOR DOS TRANSPORTADORES <i>ATP-Binding Cassette</i>	18
2.6	RESAZURINA COMO INDICADOR DA ATIVIDADE METABÓLICA FÚNGICA.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	ISOLADOS DA LINHAGEM <i>Triticum</i> DE <i>Pyricularia oryzae</i>	20
3.2	PREPARO DO MATERIAL BIOLÓGICO, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO.....	20
3.3	RESAZURINA, LEITURAS DE ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS.....	21
3.3.1	DOSE MÁXIMA TOLERADA DE CLORIDRATO DE VERAPAMIL E TESTE DE REVERSÃO DE FENÓTIPO.....	21
3.4	TRATAMENTO DE DADOS.....	22
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	DOSE MÁXIMA TOLERADA DE CLORIDRATO DE VERAPAMIL.....	24
4.2	RESPOSTA DA LINHAGEM <i>Triticum</i> DE <i>P. oryzae</i> AOS TRATAMENTOS.....	26
4.2.1	RESPOSTA AO TEBUCONAZOL (DMI).....	25
4.2.2	RESPOSTA AO FLUXAPIROXADE (SDHI).....	26

4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA NA LINHAGEM <i>Triticum</i> DE <i>Pyricularia oryzae</i> , BOMBAS DE EFLUXO E EFEITO DO CLORIDRATO DE VERAPAMIL.....	29
5	CONCLUSÕES	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Piricularia oryzae* consiste de um complexo de linhagens morfologicamente semelhantes, porém geneticamente distintas, as quais adaptaram-se a diferentes hospedeiros de espécies cultivadas, como a linhagem *Oryzae* em arroz (*PoOl*), *Triticum* em trigo (*PoTl*), *Lolium* em azevém (*PoLl*) e outras gramíneas de importância econômica (BRUNO; URASHIMA, 2001; CHAKRABORTY *et al.*, 2021).

A brusone do trigo (*wheat blast*), causada pela linhagem *Triticum* desse ascomiceto, é reconhecidamente um dos principais fatores limitantes para a expansão da triticultura no Brasil desde suas primeiras observações no estado do Paraná em 1985 (URASHIMA *et al.*, 1993). A importância do patógeno reside na susceptibilidade de grande parte das cultivares de trigo disponíveis; em sua ampla distribuição no território nacional, já tendo sido amostrado em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais; na persistência de seus inóculos em ampla variedade de espécies da família Poaceae, incluindo *Chloris distichophylla*, *Cynodon* spp., *Digitaria insularis*, *Equinochloa crusgalli*, *Panicum maximum*, *Rhynchelytrum repens* e *Sorghum sudanense*; na dispersão a distâncias moderadas por via aérea e, principalmente, em sua consistente resistência às principais moléculas fungicidas disponíveis para a cultura do trigo (URASHIMA *et al.*, 2007; MACIEL *et al.*, 2008; CASTROAGUDÍN *et al.*, 2015; CASTROAGUDÍN *et al.* 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2015; POLONI *et al.*, 2021; VICENTINI *et al.*, 2022).

Atualmente, o patógeno é motivo de preocupação internacional, pois alguns países importadores de trigo brasileiro registraram a ocorrência da brusone em anos recentes, como é o caso de Bangladesh no ano de 2016, onde a doença causou perdas significativas, com médias de aproximadamente 70% no distrito de Meherpur, 44% em Chuadanga e 37% no distrito de Jessore. Acredita-se que a introdução neste país asiático tenha ocorrido via grãos de trigo importados do Brasil. (ISLAM *et al.*, 2016; CALLAWAY, 2016). Na África, a infecção por *Piricularia oryzae* em trigo foi observada pela primeira vez em 2018, no Zâmbia, durante a estação chuvosa. Apesar de neste caso específico não ter sido possível identificar a fonte do inóculo, a hipótese mais provável permanece a de importação de grãos infectados (TEMBO *et al.*, 2020). No Brasil, as perdas causadas podem chegar, em peso por espiga, nas ordens de 46 a até 72,5%, com menores perdas observadas na infecção tardia e maiores quando a infecção é precoce (GOULART; PAIVA, 2000; GOULART *et al.*, 2007).

Além da já referida susceptibilidade da maioria das cultivares de trigo disponíveis ao patógeno, há grande preocupação quanto ao manejo da doença em virtude do uso generalizado de fungicidas com sítios-alvo específicos sem a adoção de estratégias a fim de evitar a seleção de genótipos resistentes, levando à queda da eficiência destas moléculas (CERESINI *et al.*, 2018; PAGANI *et al.*, 2014). Evidentemente, lançar mão de qualquer das duas alternativas de manejo isoladamente implacavelmente resulta em grande prejuízo ao agricultor.

A utilização de fungicidas com sítio-alvo específicos para o controle da doença tem apresentado níveis preocupantes de ineficácia (CRUZ *et al.*, 2018). Atribuem-se como fatores o ambiente e clima favoráveis ao desenvolvimento da doença no Brasil, complicações para alcançar os locais nas espigas em que a infecção se inicia e, principalmente, a sensibilidade reduzida ou resistência do patógeno, fenótipos já encontrados em isolados de *PoT1* (CASTROAGUDÍN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015; POLONI *et al.*, 2021).

Os mecanismos de resistência mais comuns a fungicidas com sítio-alvo específicos são alterações na expressão das proteínas atingidas por essas moléculas, das quais destacam-se alterações na estrutura molecular, tornando a ligação entre proteína e fungicida dificultada ou impossível; ou sua superexpressão, levando à síntese em grandes quantidades ao ponto de manter a via metabólica ativa (CASTROAGUDÍN *et al.*, 2015). Contudo, considerando o sítio-alvo dos DMIs, populações de *PoT1* estudadas até o momento não apresentaram alterações estruturais na esterol-14-demetilase ou em regiões promotoras do gene, evidenciando que o mecanismo para este patógeno deve ser mais abrangente e inespecífico do que as mutações mais comuns (POLONI *et al.*, 2021).

A resistência multidrogas (Multidrug Resistance - MDR) é um fenômeno no qual um organismo, desenvolve redução de sensibilidade a múltiplas drogas não relacionadas. Isso frequentemente é causado pela superexpressão de bombas de efluxo, ou seja, transportadores membranares responsáveis por bombear uma miríade de substâncias presentes no citosol para o meio extracelular, sendo a própria característica de inespecificidade destes componentes estruturais aos seus substratos um dos principais argumentos a favor deste mecanismo (KRETSCHMER *et al.*, 2009; OMNRANE *et al.*, 2015; FISCHER *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

Há duas principais classes de transportadores capazes de agir como bombas de efluxo para moléculas fungicidas: os transportadores ABC (ATP-binding cassette),

utilizadores de ATP no transporte de moléculas na membrana, e os MFS (major facilitator superfamily), os quais utilizam gradiente de prótons na transferência de moléculas (PERLIN *et al.*, 2014). Essas duas classes correspondem a aproximadamente metade de todos os genes codificadores de transportadores membranares dos fungos (PAULSEN *et al.*, 1998). As duas categorias de transportadores ocorrem em diferentes tipos de membranas, como vacuolares, do retículo endoplasmático, peroxissomas e das mitocôndrias (ESQUIVEL; WHITE, 2017; PERLIN *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2006; THOMAS; TAMPÉ, 2020).

Dentre possíveis substâncias candidatas, o cloridrato de verapamil (VER) se mostrou um potencial inibidor dos transportadores do tipo ABC. Gupta e colaboradores (2013), expondo *Mycobacterium tuberculosis* ao antibiótico rifampicina *in vitro*, encontraram quantidade duas vezes maior da molécula dentro das células bacterianas tratadas com VER em contraste com as testemunhas. Para o fungo *Candida albicans*, doses de VER inibiram o transporte da adesina Hwp1, associada ao desenvolvimento de hifa e sua adesão (YU *et al.*, 2014).

Utilizando isolados de populações de *PoTl* com níveis de sensibilidade ao fungicida da classe DMI tebuconazol (TBC) e ao SDHI fluxaproxade (FLX) conhecidos, atingir a reversão de fenótipo resistente para um fenótipo sensível ao expô-los à estas moléculas associadas ao VER seria uma forte evidência do papel das bombas de efluxo no mecanismo de resistência deste patógeno.

Uma vez observada a resistência multidrogas em *P. oryzae* linhagem *Triticum*, assim como a ausência de algumas das principais mutações para resistência às principais classes fungicidas, o objetivo deste trabalho foi testar o cloridrato de verapamil como inibidor de transportadores da família ABC em busca da reversão do fenótipo de resistência.

2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

2.1 DESCRIÇÃO DO PATÓGENO

Em *Pyricularia oryzae*, os conídios assexuais são caracterizados pela forma de pera, os quais consistem de três células com núcleos idênticos, apresentando coloração transparente a cinza claro, já a forma sexuada produz ascósporos de quatro células com um peritécio relativamente comprido (CRUZ; VALENT, 2017). A espécie é auto-incompatível e o cruzamento apenas ocorre no encontro de dois tipos sexualmente compatíveis (*mating type*) e férteis (KANG *et al.*, 1994), entretanto, somente sua forma assexuada ocorre naturalmente (HAYASHI; NAITO, 1997). O potencial evolutivo para aquisição de resistência a fungicidas na espécie tem como um de seus principais mecanismos o fluxo gênico e genotípico (MACIEL *et al.*, 2014) associados à grande dispersão ocorrida via vento e por sementes infectadas (CERESINI *et al.*, 2018).

Quando em superfícies úmidas, os conídios germinam e formam apressórios. Em folhas cobertas com orvalho, por exemplo, os apressórios exercem uma pressão de turgor consideravelmente alta para penetrar a planta e colonizá-la. Quando em espécies não hospedeiras, o fungo exibe dificuldade em penetrar os tecidos vegetais e, mesmo nos casos em que obtém sucesso na tentativa, as plantas exibem reações de hipersensibilidade, demonstrando a alta especificidade de suas linhagens (ARAÚJO *et al.*, 2016).

2.2 DESCRIÇÃO DA DOENÇA

A ocorrência da brusone do trigo é favorecida em umidade relativa elevada, na ordem de 90%, e em temperaturas na faixa dos 28°C, condições nas quais a produção dos conídios é intensificada (ALVES; FERNANDES, 2006). O patógeno é capaz de infectar todos os órgãos da planta, mas é mais importante na espiga, onde causa os maiores danos do ponto de vista produtivo (PRESTES *et al.*, 2007). As lesões da folha são de cor marrom escuro e centro acinzentado. Nas espigas, há descoloração na porção imediatamente superior ao ráquis, principal ponto de infecção, o qual adquire aspecto escuro (LIMA, 2004). As espigas produzem grãos pequenos, murchos e deformados que não são adequados para consumo humano (MALAKER *et al.*, 2016).

Se a infecção ocorrer antes da antese ou no início desta, pode levar à esterilidade total das espigas e abortamento dos grãos (URASHIMA *et al.*, 2009).

2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E A LINHAGEM *Triticum* DE *Pyricularia oryzae*

Pode-se classificar a resistência de duas formas: primária e secundária. A resistência primária, também chamada intrínseca, é observada como correndo naturalmente nos microrganismos sem exposição prévia à molécula antifúngica testada. A resistência secundária é fruto de seleção, ou seja, após populações suscetíveis serem continuamente expostas aos fungicidas, fenótipos com sensibilidade reduzida emergem, sendo em grande parte graças a alterações na expressão gênica (JAMIU *et al.*, 2021).

No que diz respeito às principais moléculas fungicidas utilizadas na cultura, os DMIs - inibidores da esterol-14-demetilase - têm sido utilizados desde 1989, enquanto os Qols - inibidores de quinona -, desde 2001, apresentando níveis significativos de ineficácia (CRUZ *et al.*, 2018). A resistência aos fungicidas Qol está diretamente relacionada à mutação no citocromo B, com a alteração do aminoácido glicina (G) por alanina (A) na posição 143 da proteína (G143A), encontrada em *P. oryzae* e outras espécies e gêneros de fungos (CASTROAGUDÍN *et al.*, 2015). Diante disto, não se fez necessário investigar o mecanismo de resistência a Qols em *PoTl*.

A resistência aos fungicidas DMIs, ou azóis, para a maioria das espécies estudadas com a finalidade de descrever mecanismos de resistência, como *Cercospora beticola* (SPANNER, 2021), são atribuídas a uma mutação não sinônima no sítio-alvo esterol 14-demetilase. Esta alteração, associada à expressão constitutiva do transportador *ABC1*, é um mecanismo importante na resistência a DMIs em *Candida* spp (MARICHAL *et al.*, 1999; LAMPING *et al.*, 2009). Uma vez que a maioria das substituições nos isolados brasileiros de *PoTl* são sinônimas e as não sinônimas não interferem em sua sensibilidade, levantou-se a hipótese de que o fenótipo resistente tenha sua origem na superexpressão do *CYP51*, causada por inserções em sua região promotora, porém tais inserções não foram encontradas em *CYP51A* e *CYP51B*, tornando o mecanismo de resistência a azóis ainda passível de elucidação (POLONI *et al.*, 2021).

Populações de *PoTl* amostradas nos anos de 2012 e 2018 nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, demonstraram elevados níveis de insensibilidade ao

QoI azoxistrobina (89% dos 157 isolados) e ao TBC (100% dos isolados), isolada e cumulativamente, observação que demonstra como a característica está presente em populações geograficamente distintas e pôde persistir por pelo menos seis anos em áreas de cultivo. A ausência de sensibilidade em *PoTI* se estende a moléculas às quais as populações do patógeno ainda não haviam sido expostas em campo (VICENTINI *et al.*, 2021).

Este é o caso da sensibilidade reduzida a FLX, molécula da classe das carboxamidas (SDHI), inibidoras da succinato desidrogenase, um importante componente da cadeia respiratória mitocondrial. Ainda neste trabalho conduzido por Vicentini e colaboradores (2021), o fenótipo de sensibilidade reduzida foi observado em 91,6% dos isolados de 2012. Para os isolados de populações de 2018, após a introdução dos SDHIs no país, foi observada redução na sensibilidade em aproximadamente 50% desses, além de cinco isolados altamente resistentes ao fluxapiraxade. Os autores sequenciaram o material genético dos isolados e não foram encontradas variações não sinônimas nos genes *sdhB*, *sdhC* e *sdhD*. Uma vez que há populações do patógeno apresentando este comportamento para uma molécula à qual ainda não haviam sido expostas e não foram identificadas mutações nos genes *sdhB*, *sdhC* e *sdhD*, levanta-se a hipótese de um mecanismo pré-existente e inespecífico para explicar tal fenótipo.

2.4 BOMBAS DE EFLUXO COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA MULTIDROGAS

As bombas de efluxo apresentam a peculiar característica de serem capazes de transportar diversos substratos química e estruturalmente não relacionadas, como as próprias moléculas fungicidas, herbicidas, lipídeos, esteroides etc (PRASAD *et al.*, 2019) e as principais classes de transportadores são *ATP-binding cassette* (ABC) e *Major Facilitator Superfamily* (MFS) (PERLIN *et al.*, 2014).

A superexpressão de bombas de efluxo da classe ABC tem papel fundamental na resistência a DMIs em *Candida albicans*, em particular as proteínas CDR1 e CDR2 (TAVAKOLI *et al.*, 2010). Já em *Candida krusei*, a resistência a esta classe está associada à superexpressão das bombas de efluxo CkABC1 e CkABC2, homólogas das CDR1 e CDR2, porém não foi identificado nenhum transportador da classe dos MFS nesta espécie (KATIYAR; EDLIND, 2001).

Na linhagem *Oryza* de *P. oryzae*, Lee e colaboradores (2005) estudando o gene *ABC2*, observaram aumento significativo na expressão deste na presença de DMIs - tebuconazol incluso, concluindo que os transportadores ABC desempenham papel decisivo na resistência à estes fungicidas.

Ao testar a hipótese de bombas de efluxo como mecanismo da MDR em 16 isolados de *PoTi*, Vicentini e colaboradores (2022) utilizaram quatro compostos antifúngicos já caracterizados como substratos destes transportadores, sendo eles tolnaftato (TOL), cicloheximida (CHX), rodamina 6G (RH6G) e cloreto de trifenilestanho (TPCL). A CHX serve como substrato para transportadores ABC e MFS e a maioria dos isolados apresentou sensibilidade, contudo, dois isolados que apresentaram níveis de insensibilidade não mostraram relação com a MDR. Para o TPCL e a RH6G, sete isolados apresentaram insensibilidade apenas à RH6G e nove a ambos, com boa correlação entre a concentração de eficiência necessária para reduzir o desenvolvimento do microrganismo em 50% (EC_{50}) destes substratos e a EC_{50} de DMI, ou seja, evidenciando a MDR como mecanismo de resistência plausível neste caso, com participação importante do tipo ABC, pois a RH6G é substrato específico desta classe (SILVA *et al.*, 2013). Alguns isolados resistentes a FLX mostraram fenótipo de sensibilidade a TBC e um isolado de *PoOl* se mostrou resistente a TBC e sensível a FLX, colocando o mecanismo de resistência aos inibidores da succinato desidrogenase em situação ambígua.

2.5 CLORIDRATO DE VERAPAMIL COMO INIBIDOR DE BOMBAS DE EFLUXO EM PATÓGENOS COM RESISTÊNCIA MULTIDROGAS

O cloridrato de verapamil (VER), antagonista dos canais de cálcio da classe das fenilalquilaminas, é utilizado na área da saúde nos tratamentos de hipertensão e angina de peito (KAPLAN, 1989; BROGDEN; BENFIELD, 1996). Vega-Chacón e colaboradores (2021) estudaram a inibição das bombas de efluxo em isolados resistentes e sensíveis ao DMI fluconazol (FLC) *C. albicans* por VER, sua ação conjunta com FLC e o efeito do inibidor na sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* (traça-da-cera). O efeito isolado do VER em concentrações superiores à mínima inibitória (MID = 4 mg/mL) reduziu a atividade metabólica dos biofilmes de ambos isolados, sensíveis e resistentes. A combinação de VER com FLC a 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, dose inferior à MID deste fungicida, foi capaz de reduzir de forma significativa o crescimento dos isolados

resistentes, porém não houve efeito significativo sobre os suscetíveis, explicado pela expressão regular de transportadores membranares. Corroborando este resultado, foi possível observar, a partir do uso do substrato de bombas de efluxo rodamina 123 (Rh123), que este composto foi encontrado em maiores quantidades no interior das células dos isolados sensíveis quando comparado com os resistentes. Não obstante, o uso de VER e Rh123 foi capaz de aumentar a retenção intracelular da droga nos resistentes.

2.6 RESAZURINA COMO INDICADOR DA ATIVIDADE METABÓLICA FÚNGICA

A resazurina (RZ) é um indicador metabólico visual (corante) utilizado amplamente em experimentos de sensibilidade a diversos compostos em bactérias, fungos e células de mamíferos (MANIA *et al.*, 2010). Trata-se de um composto não tóxico que age como receptor intermediário de elétrons na cadeia transportadora na mitocôndria, sem interferir em no transporte normal dos elétrons (PAGE *et al.*, 1993). Nestes experimentos, a atividade metabólica é verificada inicialmente pela coloração da amostra, uma vez que a forma reduzida apresenta aspecto róseo, enquanto sua forma oxidada possui coloração azul, portanto, amostras com coloração rosa apresentam atividade normal, enquanto as azuladas indicam redução ou paralização da respiração celular (PRAKASH *et al.*, 2018; O'BRIEN *et al.*, 2000). Estas variações geralmente são medidas com auxílio de espectrofotômetro, utilizando comprimentos de onda de 569 nm (BALBAIED; MOORE, 2020).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS DA LINHAGEM *Triticum* DE *Pyricularia oryzae*

Foram selecionados 14 isolados da linhagem *Triticum* de *P. oryzae*, classificados de acordo com seus níveis de resistência ao TBC e ao FLX, oriundos de populações amostradas nos anos de 2012 e 2018 nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e no Distrito Federal (Tabela 1).

Tabela 1 - Nomenclatura dos isolados, espécies, local, ano de amostragem populacional e fenótipos de resistência previamente identificados

Isolado	Espécie	Local ^a	Ano	Fenótipo FLX ^b	Fenótipo TBC ^b
12.1.045i	<i>PoTI</i>	SP	2012	SR	R
12.1.130	<i>PoTI</i>	MS	2012	SR	AR
12.1.037	<i>PoTI</i>	DF e GO	2012	SR	R
12.1.299	<i>PoTI</i>	PR	2012	MR	R
12.1.015	<i>PoTI</i>	MG	2012	SR	R
12.1.183	<i>PoTI</i>	MS	2012	MR	R
12.1.165	<i>PoTI</i>	DF e GO	2012	S	R
12.1.312	<i>PoTI</i>	PR	2012	MR	R
12.1.005	<i>PoTI</i>	MG	2012	S	R
18SPK6	<i>PoTI</i>	SP	2018	SR	R
18SPC10	<i>PoTI</i>	SP	2018	MR	R
18MGH19	<i>PoTI</i>	MG	2018	SR	R
18MGH25	<i>PoTI</i>	MG	2018	SR	MR
18MGF3	<i>PoTI</i>	MG	2018	MR	R

Nota: ^aDF = Distrito Federal, GO = Goiás, MG = Minas Gerais, MS = Mato Grosso do Sul, PR = Paraná, SP = São Paulo; ^bNíveis de resistência identificados em trabalho anterior de Vicentini e colaboradores (2022), para os quais S = sensível, SR = sensibilidade reduzida, MR = moderadamente resistente, R = resistente e AR = altamente resistente. Fonte:

3.2 PREPARO DO MATERIAL BIOLÓGICO, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

Os testes de reversão do fenótipo de resistência foram conduzidos em microplacas de fundo chato com 96 poços cada (KASVI, Índia). O protocolo utilizado se fundamentou na obtenção de fragmentos de micélio como matéria-prima biológica (PELAÉZ *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2020).

O micélio foi preparado após reativação dos isolados em meio meio ágar aveia (30 g.L⁻¹ de aveia integral em flocos finos, 25 g.L⁻¹ de ágar e 0,1 g.L⁻¹ do antibiótico

cloranfenicol), submetidas à temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas em incubadora tipo BOD (*biochemical oxygen demand*) pelo período de dez dias. Após a incubação, extraiu-se o micélio das colônias, transferindo-o para microtubos com 1,5 mL de capacidade, contendo 0,5 mL em volume de esferas de vidro estéreis com 2 mm de diâmetro e 1 mL de água destilada. A matéria fúngica foi fragmentada utilizando *fast-prep* ajustado para a velocidade 4.0 (4 m.s⁻¹) durante 20 segundos.

As suspensões foram diluídas para o volume final de 10 mL, sendo ajustadas para 10⁴ fragmentos por mL tomando por base contagens em câmara de Neubauer. Os fungicidas foram testados em suas doses mínimas inibitórias (MDI), sendo misturados em meio de cultura líquido à base de dextrose de batata (PD) preparados com 0.025M de solução tampão de fosfato, com pH final ajustado para 5,0.

Finalmente, cada poço da microplaca recebeu 50 µL da suspensão biológica e 100 µL de meio de cultura líquido PD, com concentrações variáveis dos inibidores e fungicidas, sendo vedada com plástico filme e mantida sem exposição à luz sob 25°C de temperatura e à agitação de 150 rpm por cinco dias.

3.3 RESAZURINA, LEITURAS DE ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS

Os poços das microplacas receberam, individualmente, 50 µL de RZ em concentração de 150 µM após o período de incubação final, a qual foi automaticamente corrigida para 40 µM nos 200 µL totais de solução em cada poço. As leituras de absorvância no tempo zero (T₀), imediatamente após a retirada das amostras de seu período de incubação, foram feitas com utilização de um leitor de microplacas (Fotômetro de Microplacas *Multiskan™ FC*, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA) calibrado para 569 nm. As leituras finais ocorreram da mesma maneira no mesmo comprimento de onda, após 4h de reação (T₄) mantidas em BOD sob temperatura de 25°C sem exposição à luz. As operações se repetiram para todos os experimentos descritos a seguir.

3.3.1 DOSE MÁXIMA TOLERADA DE CLORIDRATO DE VERAPAMIL E TESTE DE REVERSÃO DE FENÓTIPO

O trabalho foi conduzido em duas etapas. Na primeira, procuramos determinar a DMT de VER (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) utilizando quatro isolados de *P. oryzae*, dois da linhagem *Triticum* e dois da linhagem *Oryza*, obtidos da coleção existente no laboratório de genética molecular da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS). O uso de linhagens diferentes garante ao resultado uma abrangência maior, subsidiando a confiabilidade do uso posterior do inibidor de bombas de efluxo exclusivamente na linhagem *Triticum* (Tabela 2).

Na segunda etapa, foram conduzidos experimentos de reversão de fenótipo para cada isolado constante na Tabela 1 (N=14). As duas etapas foram conduzidas em delineamento inteiramente casualizado. Os seis tratamentos para cada isolado nos experimentos de reversão de fenótipo de resistência constam na Tabela 3.

Tabela 2 – Isolados utilizados e doses testadas para DMT de VER

Isolados <i>PoTI</i>	VER (mg.mL ⁻¹) ^b
18MGH11	0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0
18MGF3	
Isolados <i>PoOI</i> ^a	VER (mg.mL ⁻¹)
421	0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0
656	

Nota: ^a*PoOI* = linhagem *Oryza* de *Pyricularia oryzae*; ^bDoses testadas com base em experimentos com *C. albicans* (VEGA-CHACÓN, 2020).

Tabela 3 – Representação esquemática da distribuição dos tratamentos por isolado

Isolado <i>PoTI</i>					
-			VER ^a		
- ^b	FLX ^d	TBC ^e	- ^c	FLX ^d	TBC ^e

Nota: ^aCloridrato de verapamil = 1,0 mg.mL⁻¹; ^btratamento controle ou testemunha; ^ctratamento apenas com VER; ^ddose fluxaproxade = 5,0 µg.mL⁻¹; ^edose tebuconazol = 1,0 µg.mL⁻¹.

3.4 TRATAMENTO DE DADOS

Em posse dos valores brutos obtidos nas leituras de absorvância, foi estimada a redução da RZ para cada tratamento da seguinte maneira:

$$\Delta C = Ct_0 - Ct_4 \quad (1)$$

Na qual Ct_0 é a leitura imediatamente após a adição da RZ na amostra após cinco dias de incubação, e Ct_4 , após as quatro horas depois da adição do corante.

O Crescimento Relativo (CR) foi determinado para cada isolado individualmente como forma de tratamento de dados para uma verificação mais objetiva em contraste à testemunha, comparando-a às leituras com VER e suas combinações com fungicidas, cuja fórmula se apresenta abaixo:

$$CR = \frac{\Delta C_{tratamento}}{\Delta C_{testemunha}} * 100 \quad (2)$$

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os CRs de cada isolado nas duas etapas (DMT e reversão de fenótipo) foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade nos experimentos de determinação da DMT e de reversão de fenótipo, não sendo verificada significância ($p = 0,05$). A seguir, realizamos análise de variância pelo teste F, para então aplicar o teste Scott-Knott de comparação de médias com 5% de probabilidade.

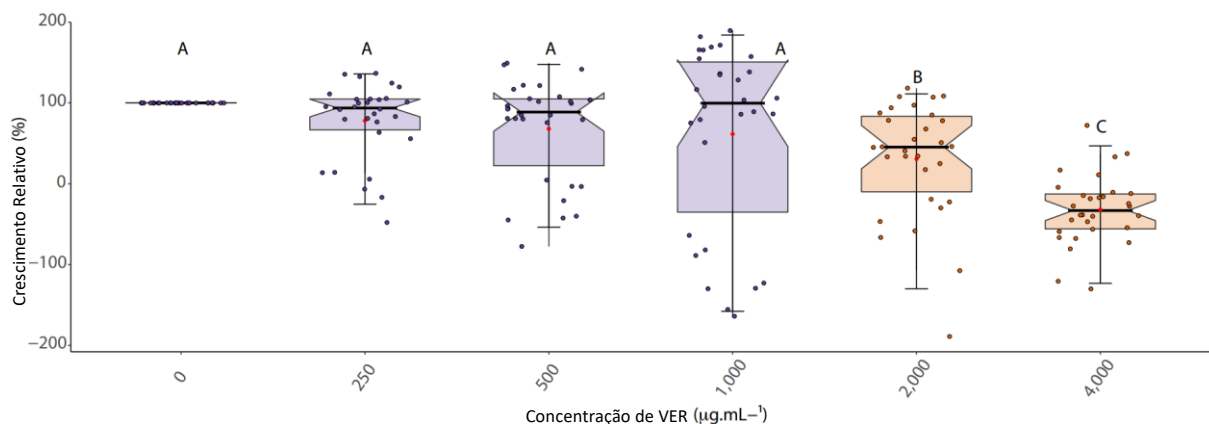
Os resultados estatísticos estão representados graficamente em *bloxplots*. Todas as análises, testes e plotagem de gráficos foram feitos com o software *R*, lançando mão da biblioteca *stats* e função *shapiro.test* para avaliação da normalidade, bibliotecas *agricolae* e *laercio* para análise de variância e, por fim, biblioteca *tidyverse* 1.3.1, pacotes *ggplot2* 3.3.5, *purrr* 0.3.4, *tribble* 3.1.6, *dplyr* 1.0.7, *tidyr* 1.1.4, *stringr* 1.4.0, *readr* 2.1.0 e *forcats* 0.5.1 e funções *ggplot*, *geom_boxplot*, *stat_summary*, *geom_jitter*, *ggtitle*, *theme* e *geom_text*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DOSE MÁXIMA TOLERADA DE CLORIDRATO DE VERAPAMIL

A análise de variância (ANOVA) para o experimento de determinação da DMT do VER para o patógeno estudado indicou diferença significativa pelo teste *F* a 5% de probabilidade, desta forma, foi realizado teste Scott-Knott para comparação de médias, os quais podem ser verificados nos *boxplots* (figura 1), ficando estabelecida a dose de 1 mg.mL⁻¹ como máxima tolerada.

Figura 1 – Determinação da DMT do cloridrato de verapamil por análise conjunta de variância no crescimento de quatro isolados de *P. oryzae*, dois da linhagem *Triticum* e dois da linhagem *Oryza*



Nota: A imagem apresenta *Boxplots* com as medianas representadas por linhas pretas horizontais, a média como círculo em vermelho saturado e os pontos com dados dispersos em roxo e laranja com brilho reduzido para evitar sobreposição. O crescimento relativo está representado verticalmente, com limite superior de 200%, enquanto as variações na dose de VER, de 0 a 4 mg.mL⁻¹ se encontram no eixo horizontal. O teste *F* para as diferentes doses do inibidor de bombas de efluxo foi significativo a, no mínimo, 5% de probabilidade. *Boxplots* com a mesma letra (A ou B) indicam que o crescimento relativo dos isolados conjuntamente não variaram conforme a dose de VER foi incrementada de acordo com teste de comparação de médias de Scott-Knott a, pelo menos, 5% de probabilidade. Fonte:

O estabelecimento da DMT em 1 mg.mL⁻¹ se deve, além do subsídio estatístico, à intenção de inibir o máximo possível as bombas de efluxo supostamente presentes nos isolados estudados. Não obstante, fica evidenciada a semelhança entre o crescimento relativo dos isolados em dose zero até a DMT, as quais não diferiram pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Desta forma, as análises estatísticas da segunda etapa de experimentos compararam três tratamentos cada: VER, FLX e VER com FLX (Figura 1); VER, TBC e VER com TBC (Figura 2).

4.2 RESPOSTA DA LINHAGEM *Triticum* DE *P. oryzae* AOS TRATAMENTOS

O crescimento dos isolados estudados não diferiu estatisticamente pelo teste *F* entre a dose zero e a DMT de VER para os 14 isolados estudados.

A análise de variância (ANOVA) indicou que, para a maioria dos isolados de *PoTI*, houve diferença significativa para o crescimento relativo entre os tratamentos (Tabela 4). Resultados similares foram encontrados por Vicentini e colaboradores (2022), os quais, segundo os autores, são indicativos da presença de outro mecanismo de resistência além das bombas de efluxo. Os perfis foram classificados de acordo com o CR para fungicida, sendo sensíveis (S) quando CR foi igual a 0%, sensibilidade reduzida (SR) para CR entre 1 e 50%, moderadamente resistente (MR) quando CR esteve entre 50 e 75% e resistente (R) para CR maior que 75%.

Tabela 4 – Análise de variância do efeito dos tratamentos com VER, FLX, TBC, suas combinações sobre os isolados e perfis de sensibilidade observado

Isolado <i>PoTI</i>	<i>F</i> _{calc} FLX	<i>p</i> FLX	PS _{FLX} ^a	<i>F</i> _{calc} TBC	<i>p</i> TBC	PS _{TBC}
12.1.045i	335,81	0,00*	SR	1,96	0,16 ^{ns}	MR
12.1.130	1,89	0,17 ^{ns}	R	1,79	0,19 ^{ns}	R
12.1.037	1,99	0,16 ^{ns}	R	0,13	0,87 ^{ns}	R
12.1.299	477,86	0,00*	SR**	8,92	0,00*	R
12.1.015	96,11	0,00*	SR	0,87	0,43 ^{ns}	R
12.1.183	6,40	0,00*	R	0,39	0,67 ^{ns}	R
12.1.165	30,52	0,00*	SR	2,45	0,11 ^{ns}	R
12.1.312	136,83	0,00*	SR	0,72	0,50 ^{ns}	R
12.1.005	573,15	0,00*	SR	3,75	0,04*	R**
18SPK6	84,72	0,00*	SR	14,34	0,00*	R
18SPC10	314,1	0,00*	SR	0,48	0,62 ^{ns}	R
18MGH19	868,05	0,00*	SR	0,42	0,66 ^{ns}	R
18MGH25	15,22	0,00*	SR	0,001	0,99 ^{ns}	R
18MGF3	1437,20	0,00*	SR	3,10	0,06 ^{ns}	R

Nota: *Significativo pelo teste *F* a 5% de probabilidade; ^{ns}não significativo; **Observada reversão do fenótipo estatística; ^aPS = Perfil de Sensibilidade. Fonte:

4.2.1 RESPOSTA AO TEBUCONAZOL (DMI)

Para 11 dos 14 isolados estudados não houve diferença significativa quanto ao crescimento para os três principais tratamentos, sendo indicativo de resistência ao

TBC. A diferença significativa nas médias do isolado 12.1.005 corresponde a sinergismo entre VER e TBC (Figura 2), com reversão do fenótipo, porém não suficiente para reduzir o crescimento relativo para quase zero, com CR de 75%. O teste de médias significativo para o isolado 12.1.299 não se tratou de reversão de fenótipo, sendo, na realidade, observada resistência ao TBC, uma vez que o crescimento para tratamento com VER associado ao TBC (CR = 77,75%) não diferiu do tratamento apenas com TBC (CR = 67,38%) (Figura 2). Por fim, o tratamento apenas com VER no isolado 18SPK6 teve média significativamente inferior (CR = 80,75%) aos outros dois tratamentos, com TBC (CR = 123,82%) e associação de ambos (CR = 109,21%).

O isolado 12.1.045i apresentou fenótipo moderadamente resistente ($50\% < CR \leq 75\%$), o qual potencialmente poderia resultar em reversão de fenótipo, porém este resultado não foi observado.

A resposta geral dos isolados ao TBC, portanto, é predominantemente de resistência moderada ou completa ($CR > 50\%$), ainda que com adição de VER, com identificação de reversão do fenótipo para o isolado 12.1.005.

4.2.2 RESPOSTA AO FLUXAPIROXADE (SDHI)

O fenótipo predominante nos isolados estudados foi de sensibilidade ao FLX, com nove de 14 apresentando $CR \leq 10\%$, contudo, ao considerar aqueles com sensibilidade reduzida ($CR \leq 50\%$), a quantidade de isolados sobe para 12 do total. Para os dois isolados cujo CR foi superior a 50% (12.1.130 e 12.1.037), não foi identificada diferença significativa entre os tratamentos testados (Figura 3).

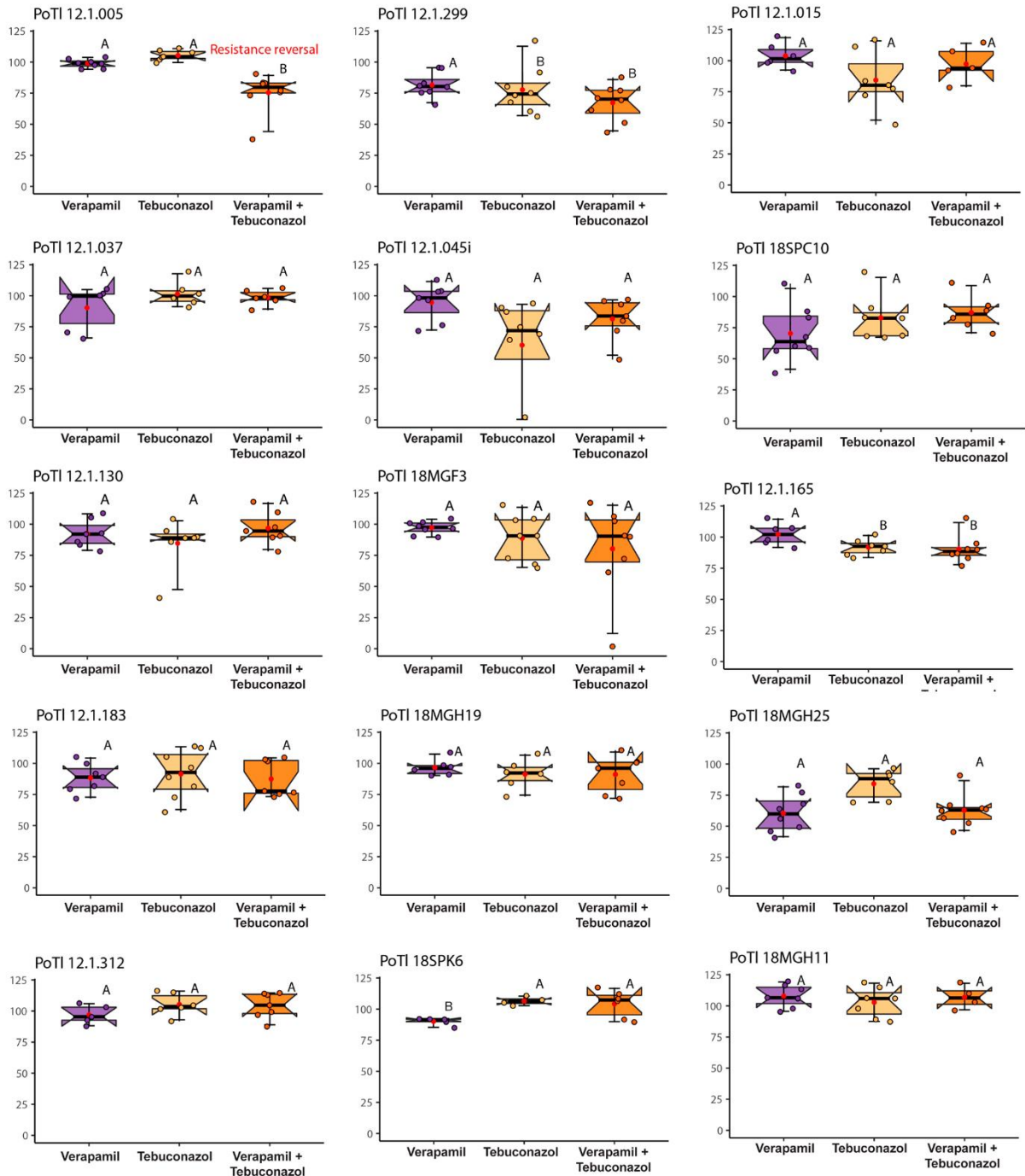
Houve diferença significativa podendo indicar reversão de fenótipo para um isolado (12.1.299), contudo, seu crescimento relativo no tratamento com VER sem adição de fungicida foi igual a 99,5%, enquanto com FLX sem VER foi 9,47% e a combinação de VER com FLX foi 1,80%. Portanto, o isolado já apresenta nível intrínseco de sensibilidade, a qual foi intensificada pela presença do VER.

Outro isolado (12.1.015) apresentou médias estatisticamente diferentes para todos os tratamentos (Figura 3), contudo, a menor média foi para o tratamento apenas com FLX (CR = 5,97%), a intermediária para a associação VER com FLX (CR = 37%) e a maior, VER sem FLX (CR = 95%), indicando que a presença do inibidor interferiu de maneira antagônica, aumentando a sobrevivência do isolado. Comportamento distinto foi observado para o isolado 12.1.183, no qual o tratamento apenas com inibidor

teve média inferior aos outros dois (CR = 84,75%), os quais não diferiram (Figura 3), contudo, tal resultado poderia ser devido a fatores não previstos no desenvolvimento do isolado em questão.

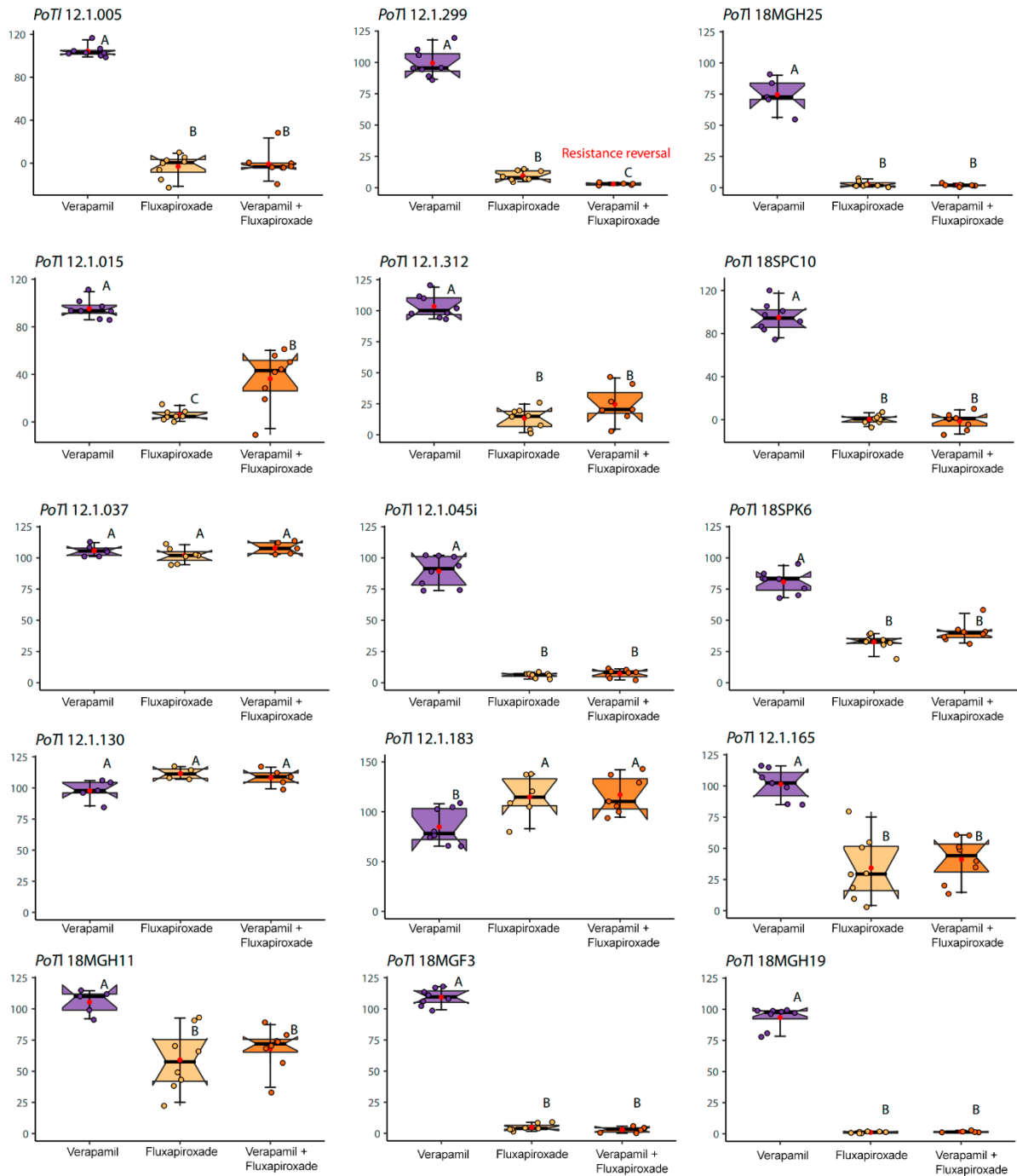
Em suma, o perfil majoritário dos isolados à exposição ao FLX é de sensibilidade (CR \leq 50%), com fenótipo de resistência para os isolados 12.1.183, 12.1.037 e 12.1.130 (CR > 75%), havendo pouca interferência do VER nestes casos. Isto é explicado pela ausência de mutações nas subunidades da succinato desidrogenase, às quais estão diretamente ligadas à resistência aos SDHIs em diversos patógenos, tais como *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Corynespora casiiicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Zymoseptoria tritici*, (SANG; LEE, 2020), às quais não foram encontradas em *PoT1*.

Figura 2 – Comparação de médias para os tratamentos com VER, TBC e VER+TBC em 14 isolados de *P. oryzae*



Nota: *Boxplots* com a mesma letra não possuem médias diferentes pelo teste de Scott-Knott a, pelo menos, 5% de probabilidade. Tratamentos encontram-se no eixo horizontal e crescimento relativo, no vertical. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Comparação de médias para os tratamentos com VER, FLX e VER+FLX em 14 isolados de *P. oryzae*.



Nota: *Boxplots* com a mesma letra não possuem médias diferentes pelo teste de Scott-Knott a, pelo menos, 5% de probabilidade. Tratamentos encontram-se no eixo horizontal e crescimento relativo, no vertical. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA NA LINHAGEM *Triticum* DE *Pyricularia oryzae*, BOMBAS DE EFLUXO E EFEITO DO CLORIDRATO DE VERAPAMIL

De maneira geral, os isolados apresentaram padrão de crescimento similar ao classificado por Poloni e colaboradores (2021) e Vicentini e colaboradores (2022) quando expostos aos fungicidas, com predomínio de fenótipos resistentes a TBC e sensíveis a FLX, sendo este último resultado esperado da baixa exposição do patógeno à molécula e à ausência de mutações não sinônimas no sítio-alvo (VICENTINI *et al.*, 2022). Soma-se isto à observação de isolados cujo crescimento não diferiu estatisticamente entre o tratamento controle e a exposição ao SDHI testado, como 12.1.130 e 12.1.037, obtidos na região Centro-Oeste no ano de 2012, resulta em fortalecimento da hipótese de um mecanismo inespecífico e pré-existente de resistência não diretamente associado à pressão de seleção. As poucas divergências parecem ser resultado da acurácia metodológica, sendo o uso da RZ na avaliação metabólica dos isolados tanto ou mais precisa que o uso de espectrofotometria sem corante indicador (SILVA *et al.*, 2023), além do uso de dose inibitória ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) superior à EC_{50} ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) estudada por Vicentini e colaboradores (2022).

Considerando a verificação de reversão parcial do fenótipo de resistência para apenas dois dos 14 isolados ora estudados, sendo um para TBC (12.1.005) e um para FLX (12.1.299), é possível que no caso das bombas de efluxo como importante mecanismo de redução de sensibilidade em *PoTl*, o VER não seja um inibidor adequado, visto que a baixa concentração da DMT não seria suficiente para inibir os transportadores de forma a reverter o fenótipo dos outros isolados resistentes, ao passo que concentrações maiores inibem o crescimento do fungo *per se* (VEGA-CHACÓN *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2014).

A resistência a fungicidas com sítios-alvo de ação específicos em *PoTl* pode ser resultado de uma combinação diversificada de mecanismos. A depender da linhagem e da população, a resistência varia para substâncias quimicamente não relacionadas, devido à maneira como essas substâncias são reconhecidas pelos sistemas de efluxo dos patógenos (POLONI *et al.*, 2021). A resistência a DMIs em *C. albicans*, por exemplo, ocorre pela combinação de alterações na estrutura do sítio-alvo, bem como sua superexpressão, superexpressão de bombas de efluxo (*CaCDR1/CaCDR2* e *MDR1*), via metabólica alternativa, aneuploidia e perda de heterozigosidade (JAMIU

et al., 2021). Em *Zymoseptoria tritici*, transportadores do tipo MFS foram identificados e descritos como uma das causas da resistência a várias moléculas inibidoras da succinato desidrogenase, incluindo o FLX (OMRANE *et al.*, 2017), sendo a duplicação de um parálogo do SdhC fator relevante neste fenótipo (STEINHAEUER *et al.*, 2019). Possíveis inibidores da classe MFS incluem as drogas inibidoras de bombas de prótons, como omeprazol e pantoprazol, sendo este último capaz de agir sinergicamente com DMIs em *C. albicans*, reduzindo sua resistência (EL-GANINY *et al.*, 2023).

As evidências citadas e apresentadas neste trabalho sugerem participação de um mecanismo de resistência não específico em *PoTl*. Há indícios significativos de que esse mecanismo esteja relacionado às bombas de efluxo quanto ao TBC, dadas as respostas observadas na presença de substratos específicos desses transportadores (VICENTINI *et al.*, 2022) e a ausência de alterações significativas no *CYP51* e seus análogos (POLONI *et al.*, 2021). Contudo, considerando que as duas reversões encontradas não são representativas para o quadro completo, e que os isolados possuem perfis de sensibilidade e resistência consideravelmente distintos para os dois fungicidas estudados, outros mecanismos devem estar envolvidos de maneira tão importante quanto as bombas de efluxo.

5 CONCLUSÕES

O uso do inibidor de bombas de efluxo, VER, não se demonstrou definitivamente capaz de reverter fenótipos de resistência para qualquer uma das duas classes de fungicidas avaliadas. Este resultado pode ser consequência tanto da interferência direta da substância no metabolismo do patógeno, quanto da impossibilidade de testes em concentrações mais altas do inibidor.

Os isolados apresentaram padrão majoritário de sensibilidade ao fungicida SDHI fluxapiraxade – sendo a ausência das mutações no sítio-alvo um fator de grande relevância – em contraste com o fungicida DMI tebuconazol, ao qual demonstraram resistência.

Há indícios de que a resistência em *PoTl*, em especial para DMIs, envolve uma combinação complexa de mecanismos, incluindo bombas de efluxo e outros fatores genéticos e moleculares além de substituições não sinônimas e alterações em regiões promotoras, sendo necessário que estudos avaliando outros mecanismos sejam formados para identifica-los.

REFERÊNCIAS

- ALVES, K. J. P.; FERNANDES, J. M. C. Influência da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulação de *Magnaporthe grisea* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 6, p. 579–584, dez. 2006.
- ARAUJO, L. *et al.* Cytological aspects of incompatible and compatible interactions between rice, wheat and the blast pathogen *Pyricularia oryzae*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 73, n. 2, p. 177–183, abr. 2016.
- BALBAIED, T.; MOORE, E. Resazurin-Based Assay for Quantifying Living Cells during Alkaline Phosphatase (ALP) Release. **Applied Sciences**, Bucharest, v. 10, n. 11, p. 3840, 31 maio 2020.
- BRITO, F. S. D. *et al.* Genetic diversity and azole fungicide sensitivity in *pseudocercospora musae* field populations in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, 2020.
- BROGDEN, R. N.; BENFIELD, P. Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in coronary artery disease. *Drugs*, v. 51, n. 5, p. 792–819, maio 1996.
- BRUNO, A. C.; URASHIMA, A. S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo e de outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 1, p. 21–26, mar. 2001.
- CALLAWAY, E. Devastating wheat fungus appears in Asia for first time. **Nature**, London, v. 532, n. 7600, p. 421–422, abr. 2016.
- CASTROAGUDÍN, V. L. *et al.* *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Leiden, v. 37, n. 1, p. 199–216, 28 dez. 2016.
- CASTROAGUDÍN, 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. 284–294, mar. 2015.
- CASTROAGUDÍN, V. L. *et al.* **The wheat blast pathogen *Pyricularia graminis-tritici* has complex origins and a disease cycle spanning multiple grass hosts.** bioRxiv, 16 out. 2017. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/203455v1>. Acesso em: 15 ago. 2023
- CERESINI, P. C. *et al.* Wheat blast: past, present, and future. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 56, n. 1, p. 427–456, 25 ago. 2018.
- CHAKRABORTY, M. *et al.* Biological and biorational management of blast diseases in cereals caused by *Magnaporthe oryzae*. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 41, n. 7, p. 994–1022, 3 out. 2021.

- 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**, Cary, v. 170, n. 2, p. 613–630, 1 jun. 2005.
- CRUZ, C. D. *et al.* Multi-environment assessment of fungicide performance for managing wheat head blast (WHB) in Brazil and Bolivia. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 44, n. 2, p. 183–191, 1 abr. 2019.
- CRUZ, C. D.; VALENT, B. Wheat blast disease: danger on the move. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 42, n. 3, p. 210–222, jun. 2017.
- 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. **Trans/Form/Ação**, Marília, v. 35, n. 1, fev. 2010.
- EL-GANINY, A. M. *et al.* Repurposing pantoprazole and haloperidol as efflux pump inhibitors in azole resistant clinical *Candida albicans* and non-*albicans* isolates. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 245–255, mar. 2022
- ESQUIVEL, B. D.; WHITE, T. C. Accumulation of Azole Drugs in the Fungal Plant Pathogen *Magnaporthe oryzae* Is the Result of Facilitated Diffusion Influx. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, 2017.
- FISHER, M. C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, [s. l.], v. 360, n. 6390, p. 739–742, 18 maio 2018.
- GLADIEUX, P. *et al.* Gene Flow between Divergent Cereal- and Grass-Specific Lineages of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e01219-17, 7 mar. 2018.
- GUPTA, S. *et al.* Efflux Inhibition with Verapamil Potentiates Bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 1, p. 574–576, jan. 2014.
- HAYASHI, N. *et al.* In vitro production on rice plants of perithecia of *Magnaporthe grisea* from Yunnan, China. **Mycological Research**, London, v. 101, n. 11, p. 1308–1310, nov. 1997.
- 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, 3 out. 2016.
- JAMIU, A. T. *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 14–30, 4 jan. 2021.
- KANG, S.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. Isolation of the mating-type genes of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* using genomic subtraction. **Genetics**, Cary, v. 138, n. 2, p. 289–296, 1 out. 1994.

KAPLAN, N. M. Calcium entry blockers in the treatment of hypertension. Current status and future prospects. **JAMA**, [s. l.], v. 262, n. 6, p. 817–823, 11 ago. 1989.

KATIYAR, S. K.; EDLIND, T. D. Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 109–116, jan. 2001.

KRETSCHMER, M. *et al.* Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multi-drug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. e1000696, 18 dez. 2009.

LAMPING, E. *et al.* Abc1p Is a Multidrug Efflux Transporter That Tips the Balance in Favor of Innate Azole Resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 2, p. 354–369, fev. 2009.

LEE, Y.-J. *et al.* A novel ABC transporter gene ABC2 involved in multidrug susceptibility but not pathogenicity in rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 81, n. 1, p. 13–23, jan. 2005.

MACIEL, J. L. N. *et al.* **Reação à brusone de genótipos de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo no estádio de planta adulta.** [S. l.: s. n.], 2008.

MALAKER, P. K. *et al.* First Report of Wheat Blast Caused by *Magnaporthe oryzae* Pathotype *triticum* in Bangladesh. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 11, p. 2330–2330, nov. 2016.

MANIA, D. *et al.* Screening for Antifungal Peptides and Their Modes of Action in *Aspergillus nidulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 21, p. 7102–7108, nov. 2010.

MARICHAL, P. *et al.* Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, London, v. 145, n. 10, p. 2701–2713, 1 out. 1999.

O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity: Resazurin as a cytotoxicity assay. **European Journal of Biochemistry**, Chichester, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, set. 2000.

OLIVEIRA, S. C. D. *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, n. 4, p. 298–304, dez. 2015.

OMRANE, S. *et al.* Plasticity of the *MFS1* Promoter Leads to Multidrug Resistance in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. **mSphere**, Botucatu, v. 2, n. 5, p. e00393-17, 25 out. 2017.

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**, Dordrecht, v. 42, n. 5, p. 609–617, 1 dez. 2014.

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 3, n. 3, p. 473–476, set. 1993.

PAULSEN, I. T.; SLIWINSKI, M. K.; SAIER, M. H. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 277, n. 3, p. 573–592, abr. 1998.

PELÁEZ MONTOYA, J. E. *et al.* **Utilización De Un Ensayo De Dilución En Microplatos Para Medir La Actividad Antifúngica De Sustancias Contra *Mycosphaella fijiensis***, MORELET. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 2006.

PERLIN, M. H.; ANDREWS, J.; SAN TOH, S. Chapter Four - Essential Letters in the Fungal Alphabet: ABC and MFS Transporters and Their Roles in Survival and Pathogenicity. *In*: FRIEDMANN, T.; DUNLAP, J. C.; GOODWIN, S. F. (ed.). **Advances in genetics**. [S. l.]: Academic Press, 2014. v. 85p. 201–253.

POLONI, N. M. *et al.* Widespread distribution of resistance to triazole fungicides in Brazilian populations of the wheat blast pathogen. **Plant Pathology**, Chichester, v. 70, n. 2, p. 436–448, fev. 2021.

PRAKASH, G. *et al.* The effect of anthracene-based chalcone derivatives in the resazurin dye reduction assay mechanisms for the investigation of Gram-positive and Gram-negative bacterial and fungal infection. **New Journal of Chemistry**, Cambridge, v. 42, n. 2, p. 1037–1045, 2018.

PRASAD, R.; NAIR, R.; BANERJEE, A. Emerging mechanisms of drug resistance in candida albicans. *In*: SÁ-CORREIA, I. (Ed.). **Yeasts in Biotechnology and Human Health**. Cham: Springer International Publishing, 2019. v. 58p. 135–153.

PRESTES, A. M. *et al.* Resistance to Magnaporthe Grisea Among Brazilian Wheat Genotypes. *In*: WHEAT PRODUCTION IN STRESSED ENVIRONMENTS. **Anais [...]** Developments in Plant Breeding. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2021.

SANG, H.; LEE, H. B. Molecular Mechanisms of Succinate Dehydrogenase Inhibitor Resistance in Phytopathogenic Fungi. **Research in Plant Disease**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1–7, 31 mar. 2020.

SILVA, T. C. *et al.* An accurate, affordable, and precise resazurin-based digital imaging colorimetric assay for the assessment of fungicide sensitivity status of fungal populations. **Agronomy**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 343, 25 jan. 2023.

SPANNER, R. *et al.* Genome-Wide Association and Selective Sweep Studies Reveal the Complex Genetic Architecture of DMI Fungicide Resistance in *Cercospora beticola*. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 13, n. 9, p. evab209, 1 set. 2021.

STEINHAUER, D. *et al.* A dispensable paralog of succinate dehydrogenase subunit C mediates standing resistance towards a subclass of SDHI fungicides in *Zyoseptoria tritici*. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 15, n. 12, p. e1007780, 20 dez. 2019.

SUN, C. B. *et al.* A Multidrug Resistance Transporter in *Magnaporthe* Is Required for Host Penetration and for Survival during Oxidative Stress. **The Plant Cell**, Cary, v. 18, n. 12, p. 3686–3705, 1 fev. 2007.

TAVAKOLI, M. *et al.* Upregulation of the ERG11 gene in *Candida krusei* by azoles. **Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran**, v. 18, n. 4, p. 276–280, 2010.

THOMAS, C.; TAMPÉ, R. Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 89, n. 1, p. 605–636, 20 jun. 2020.

URASHIMA, A. S. *et al.* Effect of magnaporthe grisea on seed germination, yield and quality of wheat. WANG, G.-L.; VALENT, B. (ed.) **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.

URASHIMA, A. S. Host Range, Mating Type, and Fertility of *Pyricularia grisea* from Wheat in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1211, 1993.

URASHIMA, A. S.; LEITE, S. F.; GALBIERI, R. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 275–279, set. 2007.

VEGA-CHACÓN, Y. *et al.* Verapamil inhibits efflux pumps in *Candida albicans*, exhibits synergism with fluconazole, and increases survival of *Galleria mellonella*. **Virulence**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 231–243, 31 dez. 2021.

VICENTINI, S. N. C. *et al.* Efflux Pumps and Multidrug-Resistance in *Pyricularia oryzae* Triticum Lineage. **Agronomy**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 2068, 30 ago. 2022b.

VICENTINI, S. N. C. *et al.* Monitoring of Brazilian wheat blast field populations reveals resistance to QoI, DMI, and SDHI fungicides. **Plant Pathology**, Chichester, v. 71, n. 2, p. 304–321, fev. 2022a.

WANG, Z.-Q. *et al.* A Putative Zn₂Cys₆ Transcription Factor Is Associated With Isoprothiolane Resistance in *Magnaporthe oryzae*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 2608, 31 out. 2018.

YU, Q. *et al.* Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 633–641, jun. 2014.