

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

SAMANTA CRISTIENE DE OLIVEIRA

**RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS ESTROBILURINAS EM POPULAÇÕES DE
PYRICULARIA ORYZAE DE ÁREAS DE TRIGO NO BRASIL**

Ilha Solteira
2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**“Resistência a Fungicidas Estrobilurinas em Populações de
Pyricularia oryzae de Áreas de Trigo no Brasil”**

SAMANTA CRISTIENE DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

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

Especialidade: Sistemas de Produção

Ilha Solteira – SP
Dezembro/2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

O482r Oliveira, Samanta Cristiene de.
Reistência a fungicidas estrobilurinas em populações de *Pyricularia oryzae* de áreas de trigo no Brasil / Samanta Cristiene De Oliveira. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2014
51 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistema de Produção, 2014

Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Inclui bibliografia

1. Brusone. 2. Citocromo B. 3. Inibidores de quinona oxidase. 4. EC50. 5. *Triticum aestivum*. 6. Resistência a fungicidas.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Resistência a fungicidas estrobilurinas em populações de *Pyricularia oryzae* de áreas de trigo no Brasil

AUTORA: SAMANTA CRISTIE NE DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA ,
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:

Paulo Ceresini

Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

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

Alcebiades Campos

Prof. Dr. ALCEBIADES RIBEIRO CAMPOS

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

Marco Antonio Basseto

Prof. Dr. MARCO ANTONIO BASSETO

Coordenadoria de Defesa Agropecuária

Data da realização: 19 de dezembro de 2014.

DEDICO

A Deus por ser o mediador da realização dessa conquista, dando-me capacidade intelectual para a realização desse trabalho.

“Porque Dele, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.” Rm 11:36

AGRADECIMENTOS

A Deus, por possibilitar essa vitória.

Ao meu esposo Patrick Almeida, por todo amor, compreensão, por me apoiar em momentos difíceis, pelo incentivo, pelas orações e por nunca ter deixado de acreditar em mim.

Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo amor e pelo o apoio.

Ao Prof. Paulo Ceresini, pela orientação, por todo apoio, amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos Erica Santos e Mateus Bristatini pelo carinho e a amizade.

Aos irmãos e ao Pastor Nelson da Igreja Batista Central de Ilha Solteira, pelo carinho, amizade e pelas orações.

A Dra. Vanina Castroagudin, pela cumplicidade e toda ajuda nas obtenções e nas análises dos dados deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia, Juliana Reges, Adriano Dorigan, Danilo Pereira, Edison Mesa, por toda ajuda, disposição durante a implementação e condução dos experimentos.

A FAPESP (Fundação de Pesquisa São Paulo, Brasil) pela concessão da bolsa de estudo de mestrado (processo 2013/03116-0).

RESUMO

A brusone, causada por *Pyricularia oryzae*, é a doença mais importante do trigo em todo Centro-Sul do Brasil. Seu controle tem dependido, fortemente do uso de fungicidas estrobilurinas, inibidores de quinona oxidase, QoI. Resistência aos fungicidas QoI (QoI-R) já foram constatadas para diversos patossistemas em todo o mundo. Neste trabalho testou-se a hipótese principal de que as populações brasileiras de *P. oryzae* associadas com o trigo permanecem sensíveis aos fungicidas QoI. Em contraste, foi testada a hipótese alternativa de que o uso extensivo e consecutivo de fungicidas QoI nas duas últimas décadas para o manejo da brusone do trigo na região Centro-Sul do Brasil, levou à emergência e a distribuição generalizada de QoI-R em populações de *P. oryzae* associadas ao trigo nas principais áreas de cultivo do país. Determinou-se, também, se outras espécies de plantas poáceas adjacentes a campos de trigo hospedavam populações QoI-R de *P. oryzae*, servindo como um reservatório de inóculo do patógeno resistente. Os principais objetivos foram estudar a ocorrência e a distribuição da resistência aos fungicidas QoI em populações de *P. oryzae* associadas ao trigo e a outras espécies de plantas poáceas adjacentes a campos de trigo no Centro-Sul do Brasil, examinando as mutações no gene citocromo b (*cyt b*) e determinando a sensibilidade dos isolados de *P. oryzae* a azoxistrobina em experimentos *in vitro*. Foi analisada a distribuição generalizada de QoI-R em populações de *P. oryzae* em campos brasileiros de trigo de 325 isolados, dos quais 198 foram derivados de trigo e 91 de outras plantas poáceas amostradas nos mesmos campos de trigo, em 2012, e 36 isolados de trigo obtidos em 2005. O sequenciamento do gene *cyt b* distinguiu nove haplótipos, dois compartilhados entre trigo e outras plantas poáceas e sete exclusivos de outras plantas poáceas. Quatro desses haplótipos apresentaram a mutação G143A associada a resistência à QoI (QoI-R). Enquanto 90% dos isolados de *P. oryzae* de trigo e 48% de plantas invasoras obtidos em 2012 apresentaram a substituição G143A e somente 36% dos isolados de 2005 apresentaram a mutação. A mutação à QoI-R foi encontrada em diferentes genótipos multiloci microssatélites de *P. oryzae*, indicando múltiplas origens. Dados fenotípicos de experimentos “*in vitro*” com base na sensibilidade a azoxistrobina à 10 µg/mL indicaram QoI-R, confirmando a ocorrência do alelo resistente no *cyt b*. A determinação da EC₅₀, concentração eficaz para causar a inibição de 50% do crescimento micelial, indicou EC₅₀= 0,04 µg/mL de azoxistrobina para os isolados sensíveis e >10 µg/mL para os resistentes. Esse é o primeiro relato da ocorrência e distribuição generalizada do alelo *cyt b* que confere altos níveis de QoI-R em populações do patógeno da brusone do trigo no Brasil. Espécies de plantas poáceas em campos de trigo, constituem um reservatório de inóculo para os isolados resistentes do fungo. Testou-se também, a hipótese de que a resistência a azoxistrobina resultou em resistência cruzada a piraclostrobina, outro fungicida QoI. Para testar esta hipótese, foi comparado o nível de resistência à piraclostrobina medindo o crescimento micelial, apresentado por dois grupos de isolados do fungo *P. oryzae* do trigo: a) sensíveis à azoxistrobina e portadores do gene *cyt b* não mutante e b) resistentes à azoxistrobina e portadores da mutação G143A no gene *cyt b*. Fungicidas pertencentes a um mesmo grupo químico apresentam resistência cruzada. Todos os isolados de *P. oryzae* do trigo sensíveis à azoxistrobina foram também sensíveis à piraclostrobina. Os isolados resistentes a azoxistrobina foram, também, resistentes à piraclostrobina, indicando que há resistência cruzada para os dois fungicidas. Entre os isolados resistentes, distinguiram-se dois grupos fenotípicos: (A) altamente resistentes e (B) resistentes. Isolados de *P. oryzae* com a presença da mutação G143A no gene *cyt b* foram 42 vezes mais resistentes à piraclostrobina. Os altos níveis de resistência à fungicidas QoI são consequências da elevada pressão de seleção provocada pelos anos consecutivos de aplicações de estrobilurinas para o manejo de doenças do trigo no Brasil.

Palavras-chaves - Brusone. Citocromo B. Inibidores de quinona oxidase. EC₅₀. *Triticum aestivum*. Resistência a fungicidas.

ABSTRACT

Wheat blast disease caused by *Pyricularia oryzae* is the most important across central-southern Brazil. Its control has relied strongly on strobilurin fungicides (Quinone oxidase inhibitors, QoI). Resistance to QoI (QoI-R) has been reported for several pathosystems worldwide. In this study we tested the hypothesis that the main Brazilian populations of *P. oryzae* associated with wheat remain sensitive to QoI fungicides. In contrast, the alternative hypothesis that extensive and consecutive use of QoI fungicides in the last two decades for the management of wheat blast in the Center-South region of Brazil was tested, led to the emergence and widespread distribution QoI-R in populations *P. oryzae* associated with the wheat in the main growing areas of the country. It is determined also whether other species of grasses adjacent fields of wheat plants housed QoI R-populations of *P. oryzae*, serving as a resistant pathogen inoculum reservoir. The main objectives were to study the occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in *P. oryzae* populations associated with wheat and other species of plants grasses adjacent to wheat fields in South-Central Brazil, examining mutations in the cytochrome b gene (*cyt b*) and determining the sensitivity of the isolates of *P. oryzae* azoxystrobin in vitro experiments. In this study, we report the widespread distribution of QoI-R in populations of *P. oryzae* from Brazilian wheat fields of 325 isolates, of which 198 derived from wheat fields and 91 from weeds within wheat fields sampled in 2012, and 36 from wheat sampled in 2005. Sequencing of *cytB* gene distinguished nine haplotypes, two of which shared between wheat and weeds-derived isolates, and seven exclusive to weed isolates. Four of these haplotypes had the G143A mutation associated with resistance to QoI (QoI-R). While 90% of the wheat isolates of *P. oryzae* and 48% of the weed-derived ones sampled in 2012 had the G143A substitution, only 36% of isolates from 2005 showed the QoI-R mutation. The mutation for QoI-R was found on distinct multilocus SSR genotypes of *P. oryzae*, indicating multiple origins. Phenotypic data from *in vitro* assays based on sensitivity to azoxystrobin at 10 µg/ml indicated QoI-R, corroborating the detection of the *cytB* resistant allele. Determination of EC₅₀ effective concentration to cause 50% inhibition of mycelial growth, indicated EC₅₀ = 0.04 µg/ml of azoxystrobin for the sensitive isolates and >10 µg/ml for the resistant ones. This is the first report of the occurrence and widespread distribution of the *cytB* allele conferring high levels of QoI-R in populations of the wheat blast pathogen in Brazil. Weed species within wheat fields were reservoir for the fungus resistant isolates. These findings point out the need to reexamine the use of strobilurins for managing wheat blast in Brazil. This study also tested the hypothesis that resistance to azoxystrobin in wheat *Pyricularia oryzae* fungus resulted in cross-resistant to pyraclostrobin other QoI fungicide. To test this hypothesis, we compared the resistance level pyraclostrobin measuring the mycelial growth presented by both groups of isolates of *P. oryzae* fungus of wheat: a) sensitive to azoxystrobin and carrier of the non- mutant *cyt b* gene and b) resistant to azoxystrobin and carrier of the G143A mutation in the *cyt b* gene. Generally, fungicides belonging to the same chemical group show cross-resistance. All *P. oryzae* isolates sensitive to azoxystrobin were also sensitive to pyraclostrobin. Isolates resistant to azoxystrobin were also resistant to pyraclostrobin, indicating cross-resistance to both fungicides. Two phenotypic groups were distinguished among the resistant isolates: (A) highly resistant and (B) resistant. In average, *P. oryzae* isolates with the G143A mutation in the *cyt b* gene were 42 times more resistant to pyraclostrobin. These high levels of resistance to QoI fungicides may be the result of high selection pressure exerted by consecutive year of strobilurins applications for the management of wheat diseases in Brazil.

Keywords - Wheat blast. Cytochrome B. Quinone oxidase inhibitors. EC₅₀. *Triticum aestivum*. Fungicide resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Sítios polimórficos na sequência do gene citocromo b (<i>cyt b</i>) a partir de 325 isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> do Brasil.	27
Figura 2	- Distribuição geográfica de isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> , amostrados de trigo e de outras espécies de plantas poáceas dentro de campos de trigo, que carregam o alelo GCT (●) QoI resistente ou o alelo GGT (●) QoI sensível do gene <i>cyt b</i> , associados com a resistência ou a sensibilidade aos fungicidas QoI, respectivamente.	28
Figura 3	- Redes de haplótipos do gene <i>cyt b</i> de isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> derivados de <i>Triticum</i> e de outras plantas poáceas.	31
Figura 4	- Distribuição <i>boxplot</i> do nível de sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> ao fungicida QoI azoxistrobina.	33
Figura 5	- Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> ao fungicida QoI azoxistrobina.	34
Figura 6	- Sensibilidade “ <i>in vitro</i> ” dos isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> do trigo sensíveis (QoI-S) e resistentes (QoI-R) ao fungicida inibidor da quinona oxidase (QoI) piraclostrobina.	41
Figura 7	- Crescimento micelial relativo médio de oito isolados sensíveis (QoI-S) e de oito isolados resistentes (QoI-R) de <i>Pyricularia oryzae</i> do trigo, ao fungicida inibidor da quinona oxidase (QoI) em diferentes doses do fungicida piraclostrobina.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Populações do patógeno da brusone <i>Pyricularia oryzae</i> isolado de trigo e de outras espécies de plantas poáceas examinadas.	21
Tabela 2	- Origem e caracterização genética e fenotípica dos isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> , da brusone do trigo, com resistência ou sensibilidade aos fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI).	25
Tabela 3	- Caracterização genética e fenotípica de populações de <i>Pyricularia oryzae</i> para resistência a fungicidas QoI por análise da sequência do gene <i>cyt b</i> e sensibilidade a azoxistrobina.	29
Tabela 4	- Caracterização fenotípica de isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> para resistência a fungicidas QoI em experimento de sensibilidade “ <i>in vitro</i> ”.	35
Tabela 5	- EC ₅₀ para um grupo de isolados do patógeno da brusone do trigo <i>Pyricularia oryzae</i> resistentes e sensíveis a QoI.	38
Tabela 6	- Valores médios de EC ₅₀ à piraclostrobina detectados para isolados sensíveis (QoI-S) e para isolados resistentes (QoI-R) ao fungicida inibidor da quinona oxidase de <i>Pyricularia oryzae</i> do trigo.	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	ORIGEM DOS ISOLADOS.....	18
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA	19
3.3	SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM FRAGMENTO INTERNO DO GENE <i>CYT B</i>	19
3.4	MÚLTIPLAS ORIGENS PARA AS MUTAÇÕES QoI-R	21
3.5	TESTE <i>IN VITRO</i> PARA A SENSIBILIDADE AO FUNGICIDA QoI	21
3.6	DETERMINAÇÃO DA EC ₅₀ PARA AZOXISTROBINA.....	22
3.7	RESISTÊNCIA CRUZADA A PIRACLOSTROBINA	23
4	RESULTADOS	25
4.1	VARIAÇÃO NO GENE <i>CYT B</i> E AMPLA DISTRIBUIÇÃO DO ALELO QoI-R	25
4.2	MÚLTIPLAS ORIGENS PARA OS HAPLÓTIPOS <i>CYT B</i> QoI-R	31
4.3	TESTE <i>IN VITRO</i> PARA SENSIBILIDADE AO FUNGICIDA QoI	31
4.4	DETERMINAÇÃO DA EC ₅₀ PARA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA A AZOXISTROBINA.....	37
4.5	RESISTÊNCIA CRUZADA A PIRACLOSTROBINA	38
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Pyricularia oryzae tem distribuição mundial, sendo considerado um dos patógenos mais destrutivos do arroz. Mais de 50 gramíneas são atacadas por esse patógeno, embora a cultura do arroz seja considerada seu hospedeiro mais importante (OU, 1985; PRABHU et al., 2003). Ocorrendo de forma generalizada em todas as regiões rizícolas do mundo (SILVA et al., 2009). No último século, emergiu como patógeno importante adaptado ao trigo no Sul do Brasil causando a doença brusone (IGARASHI et al., 1986) e já se espalhou para outros países que cultivam trigo na América do Sul, como Bolívia e Paraguai (DUVEILLER; HODSON; TIEDMANN, 2010). A brusone do trigo foi relatada pela primeira vez em meados da década de 80 e vem ocupando um papel de destaque por proporcionar perdas no peso, por espiga, de até 72,5%, dependendo da época da infecção (GOULART; PAIVA, 2000).

O controle das doenças do trigo tem sido difícil devido às condições climáticas extremamente favoráveis à doença no Brasil e a falta de resistência durável (ANJOS et al., 1996; KOHLI et al., 2011). Atualmente, o controle da brusone do trigo depende fortemente da aplicação de fungicidas foliares (MACIEL, 2011; MACIEL et al., 2014), especialmente as estrobilurinas formuladas como o único ingrediente ativo ou em misturas com outros fungicidas. As estrobilurinas estão no mercado de fungicidas desde 1996 e pertencem ao grupo de fungicidas conhecidos como inibidores de quinona oxidase, QoI (BRENT; HOLLOMON, 1998). Os fungicidas QoI inibem a respiração mitocondrial por ligação ao sítio Qo da enzima do complexo III ou citocromo *b-c1*, impedindo a transferência de elétrons e deste modo, interrompem a respiração mitocondrial e a produção de ATP dentro das hifas fúngicas (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Por bloquear um único sítio específico, os fungicidas QoI são considerados de alto risco para o desenvolvimento de resistência em fungos. Na verdade, o risco para o desenvolvimento de resistência à QoIs foi antecipado previamente à sua introdução comercial (BRENT; HOLLOMON, 1998; GRASSO et al., 2006).

Sob condições de campo, a resistência a fungicidas QoI tem sido associada a mutações de um único nucleotídeo na sequência do gene do citocromo b (*cyt b*), provocando alterações na sequência de aminoácidos que impedem a ligação do fungicida (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Duas substituições de aminoácidos, de glicina por alanina na posição 143 (G143A) ou de fenilalanina por a leucina na posição 129 (F129L), foram detectadas na proteína citocromo b da maior parte dos fungos fitopatogênicos relatados como resistentes aos fungicidas QoI (GISI et al., 2002; GRASSO et al., 2006). Nos últimos 18 anos, mais de 30

espécies alocadas em 20 gêneros de fungos fitopatogênicos com resistência de campo aos fungicidas QoI foram relatadas (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008; FRAC, 2013). Essa lista inclui patógenos de trigo como *Erysiphe graminis tritici*, *Microdochium nivale*, *Mycosphaerella graminicola*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria tritici* (FRAC, 2013). Desde 2010, duas espécies de *Pyricularia* spp. com resistência a fungicidas foram incluídas na lista do Comitê de Ação à Resistência a Fungicidas (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC) (FRAC, 2013). A resistência a QoI foi relatada em populações de *P. oryzae* associada ao arroz e populações de *P. grisea* associada como azevém perene (*Lolium perenne*) (AVILA-ADAME, 2014; FRAC, 2013, KIM et al., 2003; KUNOVA; PIZZATTI; CORTESI, 2012; MA; UDDIN; OLAYA, 2009; VINCELLI, DIXON, 2002).

A aplicação de fungicidas QoI deveria ter sido uma grande preocupação para o manejo da brusone do trigo desde o momento em que as estrobilurinas foram consideradas ineficazes para controle de doenças do trigo no campo (CRUZ et al., 2011; DUVEILLER; HODSON; TIEDMANN, 2010). Por sua vez, a ineficácia dos fungicidas QoI para o manejo da brusone do trigo tem sido atribuída a três fatores: a) as lacunas significativas no conhecimento das variáveis epidemiológicas que influenciam esta doença; b) a compreensão incompleta do ciclo da doença causada pelo patógeno; e c) as dificuldades técnicas que impedem a completa proteção da espiga do trigo durante a aplicação dos fungicidas (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007; GOULART et al., 1996, TALBOT, 2003). A possibilidade de que resistência de campo a fungicidas QoI poderia ter emergido em populações de *P. oryzae* não foi considerada como uma causa plausível para a eficácia limitada atual de fungicidas estrobilurinas para o controle da doença. Mesmo assim os fungicidas QoI têm sido usado extensivamente e de forma contínua para o manejo das doenças do trigo nos últimos 15 anos (MACIEL, 2011), portanto, a alta pressão de seleção imposta por esse fungicida de alto risco pode ter favorecido o desenvolvimento de populações altamente resistentes do patógeno *P. oryzae* que infectam o trigo no Brasil. Apesar do fato do cenário de resistência a QoI (QoI-R) ter sido relatado para muitos outros patossistemas em todo o mundo, incluindo patossistemas associados ao trigo, a ocorrência e distribuição de QoI-R em populações do patógeno *P. oryzae* da brusone do trigo nunca foi examinado no Brasil.

Neste trabalho testou-se a hipótese principal de que as populações brasileiras de *P. oryzae* associadas com o trigo permanecem sensíveis aos fungicidas QoI. Em contraste, foi testada a hipótese alternativa de que o uso extensivo e consecutivo de fungicidas QoI nas duas últimas décadas para o manejo da brusone do trigo na região Centro-Sul do Brasil, levou à

emergência e a distribuição generalizada de QoI-R em populações de *P. oryzae* associadas ao trigo nas principais áreas de cultivo do país. Determinou-se, também, se outras espécies de plantas poáceas adjacentes a campos de trigo hospedavam populações QoI-R de *P. oryzae*, servindo como um reservatório de inóculo do patógeno resistente. Os principais objetivos foram estudar a ocorrência e a distribuição da resistência aos fungicidas QoI em populações de *P. oryzae* associadas ao trigo e a outras espécies de plantas poáceas adjacentes a campos de trigo no Centro-Sul do Brasil, examinando as mutações no gene *cytB* e determinando a sensibilidade dos isolados de *P. oryzae* a azoxistrobina em experimentos *in vitro*. Testou-se também, a hipótese de que a resistência a azoxistrobina resultou em resistência cruzada a piraclostrobina, outro fungicida QoI. Para testar esta hipótese, foi comparado o nível de resistência à piraclostrobina apresentado por dois grupos de isolados do fungo *P. oryzae* do trigo: a) sensíveis à azoxistrobina e portadores do gene *cyt b* não mutante e b) resistentes à azoxistrobina e portadores da mutação G143A no gene *cyt b*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O trigo (*Triticum aestivum* L.) ocupa papel de destaque dentre os cereais produzidos no Brasil, tendo uma importante função econômica e social. Apesar dessa importância, seu potencial não tem sido explorado devidamente. Uma das limitações de maior destaque é a ocorrência frequente de doenças que causam queda da produtividade, devido às condições propícias para sua ocorrência nas áreas onde esse cereal é cultivado no país. Dentre essas, está a brusone do trigo, uma doença causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* (GOULART; PAIVA, 2000).

Em outras partes do mundo, não há relatos de que *P. oryzae* infecta trigo. Na última década, *P. oryzae* foi identificado como agente causal da brusone em cevada, centeio e tritcale em áreas do Centro-Oeste e na região Sul do Brasil (LIMA; MINELLA, 2003). Considerando a importância econômica dessas *commodities* agrícolas, a doença causada por *Pyricularia* em tritcale, trigo e cevada tem grande importância mundial. De fato, o patógeno da brusone do trigo também está catalogado como um sério patógeno quarentenário que ameaça a agricultura Americana (MADDEN; WHEELIS, 2003; STRANGE; SCOTT, 2005; KOHLI et al., 2011).

A proximidade entre plantas cultivadas e suas invasoras pode facilitar a troca ou o salto de hospedeiros por patógenos associados com uma ou outra das espécies (STUKENBROCK; MCDONALD, 2008). Acredita-se que processo semelhante foi responsável pela emergência da brusone do trigo no Brasil, ainda que se desconheça o hospedeiro original de *P. oryzae* adaptado ao trigo (CERESINI, 2011).

O agente causal da brusone ataca toda a parte aérea do trigo, porém, o sintoma mais característico é observado nas espigas. Quando a infecção ocorre na ráquis, a espiga apresenta branqueamento parcial ou total da parte imediatamente superior à lesão (ponto preto e brilhante no local de penetração do fungo), resultando em esterilidade ou enchimento parcial dos grãos, também conhecido por “chochamento” (IGARASHI, 1988). O principal dano da brusone ocorre pelo impedimento do transporte de água e nutrientes até os grãos em formação, localizados acima do ponto de infecção inicial na ráquis (SANTANA et al., 2013).

O controle da brusone do trigo requer, entre outras, a adoção de medidas como a semeadura de cultivares com maior nível de resistência; a utilização de sementes sadias; a escolha da melhor época de semeadura, evitando-se a coincidência de condições de umidade (chuvas/molhamento) favoráveis à doença por ocasião do espigamento do trigo (SANTANA et al., 2013). Entretanto, mesmo com a adoção dessas e das demais medidas que compõem o

manejo integrado de doenças da cultura do trigo, a possibilidade de controle da brusone não é plenamente assegurada devido às circunstâncias como a condição de extrema agressividade que a brusone apresenta sob condições climáticas favoráveis, associada ao elevado grau de suscetibilidade à doença que as cultivares de trigo disponíveis no Brasil apresentam (MACIEL, 2011). O uso de fungicidas na parte aérea é uma das alternativas que o produtor de trigo dos locais com histórico de ocorrência da doença pode adotar com a expectativa de ter algum controle da brusone (SANTANA et al., 2013).

Nos últimos 30 anos, devido à inexistência de cultivares de trigos resistentes e fungicidas eficazes para controlar a brusone (KOHLI et al., 2011; MACIEL, 2011; NAVARINI; BALARDIN, 2012; PAGANI; DIANESE; CAFÉ-FILHO, 2014), o patógeno alcançou ampla distribuição espalhando-se rapidamente pela maioria das áreas produtoras de trigo no Brasil (ANJOS et al., 1996). O patógeno que inicialmente foi identificado em alguns municípios do norte do Paraná, rapidamente se disseminou para outras regiões tritícolas do país, a saber: São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Goiás, cerrado do Brasil Central (SILVA et al., 2009).

A busca por resistência à brusone tem sido intensa desde o primeiro relato da doença no final da década de 80, porém seus resultados são considerados erráticos e inconsistentes (GOULART; PAIVA, 1992; GOULART; PAIVA; ANDRADE, 1995; MACIEL et al., 2008; CRUZ et al., 2010), pelo fato dos genótipos de trigo aparentemente resistentes se comportarem como suscetíveis em outras regiões do país (URASHIMA et al., 2004).

Maciel et al. (2014) baseando-se na reação diferencial de um grupo de sete cultivares de trigo, após analisar uma população de cerca de 150 isolados do patógeno coletados em 2005 descreveram a ocorrência de oito grupos de virulência do patógeno com distribuição distinta em diferentes regiões do Centro-Sul do Brasil. Essa descoberta possivelmente explica a variação do comportamento dos cultivares de trigo cultivados no país.

Desde 1976, a utilização de fungicidas constitui-se em uma indicação técnica oficial integrante das opções de controle das doenças da parte aérea da cultura de trigo no Brasil (REIS; LUZ, 1976). Essa estratégia, embora viabilize técnica e economicamente a produção de trigo, é um dos tratos culturais que mais onera os custos de produção. Além disso, o controle químico da brusone em trigo tem dificuldades peculiares ao patossistema. São poucos os ingredientes ativos registrados no Brasil para o controle da doença, e sua eficiência média de controle é de cerca de 50% (GOULART, 2004).

Sob o ponto de vista do manejo químico, a ineficácia de fungicidas no manejo da brusone do trigo é atribuída ao desconhecimento de aspectos importantes da biologia do

patógeno, se a fonte de inóculo primário restringe-se a sementes, a restos de cultura ou qual a importância de plantas invasoras como fonte de inóculo, além das dificuldades para proteção das espigas, aparentemente o único órgão da planta sujeito à infecção (KOHLI et al., 2011; MACIEL, 2011, NAVARINI; BALARDIN, 2012; PAGANI; DIANESE; CAFÉ-FILHO, 2014; URASHIMA et al., 2004; GOULART; PAIVA; ANDRADE, 1995). Surpreendentemente, a possibilidade de resistência de campo a fungicidas específicos não foi considerada como explicação plausível para a limitada eficácia de fungicidas para o manejo da brusone do trigo no país (MACIEL, 2011, NAVARINI; BALARDIN, 2012; PAGANI; DIANESE; CAFÉ-FILHO, 2014). Mesmo com as limitações de eficácia apontadas para o manejo químico da brusone do trigo, o manejo de outras doenças da parte aérea do trigo no Brasil tem sido baseado fortemente na aplicação de fungicidas em função de condições extremamente predisponentes à ocorrência de doenças (GOULART; PAIVA, 2000; DUVEILLER; HODSON; TIEDMANN, 2010). Entre diversos grupos de fungicidas utilizados no manejo das doenças do trigo, as estrobilurinas tem recebido destaque.

As estrobilurinas são compostos químicos extraídos, a princípio, do fungo *Strobilurus tenacellus*, os quais são amplamente usados como fungicidas na agricultura. Comercializadas desde o final do século XX, as estrobilurinas são conhecidas como fungicidas inibidores da quinona oxidase, ou fungicidas QoI, por terem como único modo bioquímico de ação a inibição da respiração mitocondrial, atuando no sítio Qo (BRENT, 1995; BRENT; HOLLOMON, 1998; PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009). A toxicidade das estrobilurinas é proveniente da inibição da cadeia respiratória ao nível do complexo III ou citocromo *b-c1*, impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, interferindo na respiração do patógeno (GHINI; KIMATI, 2000). São tipicamente absorvidas pela cutícula do fungo, agindo como fungicidas protetores (VINCELLI; DIXON, 2002). Algumas das estrobilurinas mais comuns são azoxistrobina, metil-cresoxima, picoxistrobina, fluoxastrobina, orizastrobina, dimoxiystrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina (PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009).

A interferência das estrobilurinas na respiração mitocondrial ocorre pelo bloqueio da transferência de elétrons no citocromo b (codificado pelo gene *cyt b*). Na maioria dos patógenos, incluindo *P. oryzae*, a resistência à estrobilurina no *cyt b* resulta na alteração de um aminoácido no códon 143 da glicina por alanina (G143A) (GISI et al., 2002). Por ter um único sítio de ação nas células fúngicas, o emprego contínuo das estrobilurinas pode representar alto risco de aquisição de resistência para populações fúngicas (VINCELLI; DIXON, 2002; RODRIGUES et al., 2007). Fungicidas pertencentes a um mesmo grupo

químico apresentam resistência cruzada. Resistência cruzada ocorre quando populações de patógenos que desenvolvem resistência a um fungicida tornam-se resistentes a outros fungicidas que são afetados pela mesma mutação gênica e pelo mesmo mecanismo de resistência (FRAC, 2013). Para as estrobilurinas, a resistência cruzada pode ocorrer para a azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina (GHINI; KIMATI, 2000). Essa informação é importante na adoção de estratégias anti-resistência (RODRIGUES et al. 2007).

Resistência a fungicidas QoI tem sido observada na Europa e na Ásia em fitopatógenos em diversas culturas, incluindo, trigo (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), cevada (*B. graminis* f. sp. *hordei*), banana (*Mycosphaerella fijiensis*), videira (*Plasmopara viticola*) e macieira (*Venturia inaequalis*) (KIM et al., 2003).

Dois mecanismos de resistência para o fungicida QoI tem sido relatado. O primeiro envolve mutação do gene citocromo b, resultando em alterações na sequência de nucleotídeos que impedem a ligação com o fungicida. Essa mutação resulta em resistência completa do patógeno ao fungicida. Um segundo mecanismo de resistência, porém menos comum, ocorre *in vitro* e foi identificado em vários fungos patogênicos, incluindo *P. oryzae*, *Septoria tritici*, *Botrytis cinerea*, e *V. inaequalis*. Esse mecanismo envolve a atividade de uma enzima oxidase alternativa (AOX-Mg), a qual oxida a ubiquinona, enquanto transforma oxigênio a água. Isso evita o bloqueio induzido pelos QoI na cadeia de transporte de elétrons (KIM et al., 2003). Em *P. oryzae*, o gene *aox - Mg* é expresso “*in vitro*”, em resposta ao estresse oxidativo, contudo, a transcrição de *aox - Mg* é reprimida “*in planta*”, permitindo que fungicidas QoI sejam utilizados para controlar a doença causada por *P. oryzae* e outros fungos fitopatogênicos (KIM et al., 2003).

A resistência aos fungicidas à base de estrobilurina é atualmente considerada um fenômeno comum, inclusive para *P. oryzae* (FRAC, 2013). Nos Estados Unidos, desde o início do século XXI, pouco tempo depois da introdução do uso de estrobilurinas na agricultura mundial, já havia relatos de resistência a fungicidas QoI em populações de *P. oryzae* patogênico a *Lolium perenne* ou azevém (KIM et al., 2003). A resistência a QoI em populações de outro patógeno do trigo foi recentemente relatada por Torriani et al. (2008). A mutação G143A no gene citocromo *b-c1* causando resistência a fungicidas QoI foi detectada em todas as populações do fungo na Europa (Reino Unido, Dinamarca, Irlanda, França e Alemanha), indicando que a mutação para resistência a fungicidas QoI ocorre de forma recorrente e independente em genótipos distintos do patógeno e em regiões geográficas diferentes (TORRIANI et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DOS ISOLADOS

Um total de 325 isolados monospóricos de *P. oryzae* foram utilizados neste estudo. Destes, 289 foram isolados de amostras coletadas em campo de sete Estados brasileiros em 2012 (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo), tendo sido amostradas através de transectos dentro de cada campo (Tabela 1). Entre os isolados obtidos em 2012, 198 foram obtidos de amostras de trigo com sintomas de brusone e 91 de diferentes espécies de plantas poáceas localizadas dentro ou adjacentes aos campos de trigo, com lesões foliares típicas da brusone. Os 36 isolados restantes de *P. oryzae* foram obtidos de campos de trigo amostrados em 2005, representando genótipos microsatélites multiloci distintos detectados em todas as principais áreas de cultivo de trigo no Brasil (MACIEL et al., 2014).

O isolamento dos fungos ocorreu a partir de plantas de trigo infectadas com fungos da brusone do trigo. Tecidos infectados de plantas doentes foram cortados em pequenos pedaços e colocados em solução 1:1 de água sanitária e água destilada autoclavada, por 1 minuto. Em seguida retirou-se a solução com auxílio de uma peneira e béquer. Em um béquer colocou-se o material vegetal com água destilada autoclavada no material vegetal durante 1 minuto. Retirou-se a água destilada autoclavada coando na peneira e colocou o material vegetal em papel filtro autoclavado duas vezes. Retiraram-se os pedaços do material vegetal e colocou-os em placa de Petri com batata dextrose e Agar, em seguida, levou as placas a incubadora à 25°C por 5 dias. Após cinco dias retirou os pedaços de material vegetal que continham crescimento fúngico da placa de Petri com auxílio de uma pinça, colocou-se um pedaço de material vegetal em um tubo de vidro com água destilada autoclavada. O tubo de vidro foi colocado no agitador para a obtenção dos esporos. Após a agitação, foi despejada a solução do tubo em placa de Petri com agar-água. As placas foram levadas para incubadora à 25°C. Para o armazenamento em longo prazo, as culturas puras foram cultivadas em placas de Petri com aveia e agar, sobre papel filtro cortados e esterilizados e colocados em incubadora a 25°C. Após o crescimento do fungo sobre o papel filtro, foram retirados os cortes de papel filtro e colocados para secar completamente à 25°C, depois de secos foram retirados e mantidos num microtubo com sílica gel à 5°C (MACIEL et al., 2014; URASHIMA; IGARASHI; KATO, 1993).

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para as análises de genotipagem do gene *cyt b*, o DNA do fungo foi extraído de micélios liofilizados usando-se o *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

3.3 SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM FRAGMENTO INTERNO DO GENE *CYT B*

Um fragmento interno do gene *cyt b* foi amplificado de 325 isolados de *P. oryzae* por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores PgCytb-F1 (5'-AGTCCTAGTGTAATGGAAGC-3') e PgCytb-R1 (5'-ATCTTCAACGTGTTTAGCACC-3') desenhados por Kim et al. (2003). As amplificações de PCR foram realizadas em reações de 25-µl de volume usando água destilada ultrapura, ~ 30 ng de DNA molde, 0,1 µM de cada iniciador, 80 µM de cada dNTP, MgCl₂ 2,5 mM, 2,5 µl de tampão de reação de PCR a 10X (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e 0,1 unidades de Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich, MO, EUA). A amplificação foi realizada em um termociclador de PCR Nexus Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com as seguintes condições dos ciclos: desnaturação inicial à 95°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos à 95°C durante 45 segundos, à 55°C durante 45 segundos e à 72°C durante 45 segundos, com uma extensão final à 72°C durante 8 minutos. Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul), utilizando o kit de reação *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready* em um sequenciador ABI 3730xl automatizado (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências foram visualizadas e alinhadas com o programa Geneious R 6.7.1 (Biomatters, Nova Zelândia). As sequências parciais do *cytb* (510 bp de comprimento) foram manualmente analisadas para a presença de mutações conhecidas por conferir resistência a QoI: uma transição de G para C no códon 428 (G143A) ou uma transversão de C para A no códon 387 (F129L) (KIM et al., 2003). Redes de haplótipos foram construídas com o programa TCS 1.21 usando-se o método de parcimônia estatística (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000). As sequências de DNA AY245424, AY245425, AY245426 e AY245427 (KIM et al., 2003) foram recuperadas do banco de dados do GenBank / NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (GENBANK/NCBI, 2014) e usadas como referência para comparação. Todas as sequências *cytb* obtidas nesse estudo foram depositadas no GenBank / NCBI.

Tabela 1 - Populações do patógeno da brusone *Pyricularia oryzae* isolado de trigo e de outras espécies de plantas poáceas examinadas.

População	Ano de amostragem	Hospedeiro	N
Centro-Sul do Brasil	2005	<i>Triticum aestivum</i>	36
Distrito Federal	2012	<i>T. aestivum</i>	21
		<i>Axonopus obtusifolius</i>	1
Goiás	2012	<i>T. aestivum</i>	20
		<i>Cyperus rotundus</i>	1
Minas Gerais	2012	<i>T. aestivum</i>	18
		<i>Digitaria sanguinalis</i>	1
Mato Grosso do Sul	2012	<i>T. aestivum</i>	48
		Outras espécies de plantas poáceas	50
		<i>Avena sativa</i>	12
		<i>Chloris distichophylla</i>	3
		<i>Cenchrus echinatus</i>	11
		<i>D. sanguinalis</i>	3
		<i>Elionurus candidus</i>	1
		<i>Echinochloa crusgalli</i>	5
		<i>Panicum maximum</i>	5
		<i>Urochloa</i> spp.	10
Paraná	2012	<i>T. aestivum</i>	42
		Outras espécies de plantas poáceas	37
		<i>A. sativa</i>	2
		<i>C. distichophylla</i>	6
		<i>C. echinatus</i>	2
		<i>Cynodon</i> spp.	1
		<i>D. sanguinalis</i>	6
		<i>Eleusine indica</i>	3
		<i>E. candidus</i>	1
		<i>Eragrostis plana</i>	2
		<i>P. maximum</i>	2
		<i>Rhynchelytrum repens</i>	4
		<i>Sorghum sudanense</i>	1
		<i>Urochloa</i> spp.	7
Rio Grande do Sul	2012	<i>T. aestivum</i>	30
		<i>D. sanguinalis</i>	1
São Paulo	2012	<i>T. aestivum</i>	19
Total			325

Fonte: Dados da pesquisa da autora

3.4 MÚLTIPLAS ORIGENS PARA AS MUTAÇÕES QoI-R

A fim de determinar se as mutações QoI-R no gene *cyt b* emergiram várias vezes em *P. oryzae* de distintos genótipos, verificamos a associação de mutações no gene *cyt b* com genótipos multiloci microssatélites (GMM) particulares do fungo. Determinou-se utilizando 11 marcadores microssatélites baseados em sequências repetitivas simples (SSR) (cnpt_mg-c013, -c047, -c060, -c065, -c108, -c129, -c147, -c168, -c233, -c248 e -p1e11), como descrito anteriormente (PEREIRA et al., 2014). Os dados dos GMM dos isolados obtidos em 2005 foram os de Maciel et al. (2014).

3.5 TESTE *IN VITRO* PARA A SENSIBILIDADE AO FUNGICIDA QoI

A sensibilidade ao fungicida foi avaliada em 249 isolados de *P. oryzae* previamente genotipados para o gene *cyt b*, 156 isolados derivados do trigo e 58 de outras espécies de plantas poáceas em campos amostrados em 2012, e 35 isolados de trigo amostrados em 2005. O teste de sensibilidade *in vitro* seguiu o procedimento descrito por Torriani et al. (2008), com modificações. Para a produção dos inóculos, os isolados foram cultivados em batata dextrose e ágar (BDA, Himedia) com adição de 50 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de estreptomicina e incubados a 25°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro por cinco dias. O fungicida Priori® (azoxistrobina 250 g/L, Syngenta) foi diluído 100 vezes em água deionizada para produzir uma solução estoque. O meio de cultura do experimento foi preparado pelo resfriamento do BDA a 55°C e logo após foi adicionado 80 µg/mL de ácido salicilhidroxâmico (SHAM), necessário para suprimir a via da oxidase alternativa, a solução estoque do fungicida Priori® e a preparação das doses 0 e 10 µg/mL de ingrediente ativo (azoxistrobina). Discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram cortados a partir da borda das colônias e transferidos para o meio de cultura de placas contendo ou não azoxistrobina, com o lado coberto pelo micélio virado para baixo. Foram testados quatro isolados por placa e cada placa foi repetida seis vezes. Mediu-se o crescimento diametral (mm) das colônias que cresceram à 25°C durante cinco dias, subtraindo o diâmetro original do disco micelial (5 mm). O crescimento micelial na dose de 10 µg/mL de ingrediente ativo foi convertido em crescimento relativo (RG) para cada isolado: $100 \times (\text{diâmetro médio da colônia em meio com fungicida}) / (\text{diâmetro médio da colônia em meio sem fungicida})$. Os valores de RG foram usados para a análise estatística. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso. Um subgrupo representativo de 83 amostras (54 isolados de trigo e 29 isolados de outras plantas

poáceas) foi selecionado para conduzir o experimento uma segunda vez. Os isolados de trigo e de outras plantas poáceas foram testados em experimentos separados. Os isolados MO12.0.337 (sensível à QoI, QoI-S) e MO12.0.733 (resistente à QoI-QoI-R), foram incluídos como controle em todos os experimentos. Os experimentos foram analisados individualmente. A análise de variância foi realizada para avaliar o efeito de isolados, de blocos e sua interação. Para as comparações entre as médias dos isolados, foi aplicado o teste de Fisher baseado na diferença mínima significativa entre médias (DMS). As análises estatísticas foram realizadas com o programa SAS ver. 9.2 (SAS INSTITUTE INC., 2011).

3.6 DETERMINAÇÃO DA EC_{50} PARA AZOXISTROBINA

Os valores de EC_{50} , concentração eficaz para causar a inibição de 50% do crescimento micelial ($RG = 0,50$) foram determinados para dois grupos de isolados (Tabela 2): a) oito isolados QoI-S sensíveis a azoxistrobina (MO12.1.129, MO12.1.132, MO12.1.130, MO12.1.150, MO12.1.237, MO12.1.239, MO12.1.240 e MO12.1.280) e b) sete isolados QoI-R resistentes a azoxistrobina (MO12.1.023, MO12.1.028, MO12.1.030, MO12.1.040, MO12.1.068, MO12.1.127 e MO12.1.146), seguindo os procedimentos descritos por Ma, Uddin e Olaya (2009), com modificações. A preparação dos meios de cultura, a transferência de material fúngico e a incubação foram realizadas como descrito acima no item 3.5. Os isolados foram testados em meio de cultura com SHAM (80 $\mu\text{g/mL}$) e fungicida azoxistrobrina (Priori®, solução estoque diluída 100 vezes como descrito anteriormente), para atingir as concentrações finais de 0,00; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00; 7,00 e 10,00 $\mu\text{g/mL}$ de ingrediente ativo. Quatro isolados foram dispostos em cada placa, com quatro repetições cada tratamento. O crescimento micelial de *P. oryzae* nas diferentes doses testadas foi convertido em crescimento relativo (RG). As concentrações do fungicida foram transformadas em logaritmo natural. Para o cálculo dos valores de EC_{50} de cada isolado, utilizou-se o programa ED50plus v1.0 (VARGAS, 2000). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e o experimento foi conduzido duas vezes. A análise de variância e o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para comparação de médias de EC_{50} de cada isolado foram efetuados utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.7 RESISTÊNCIA CRUZADA A PIRACLOSTROBINA

Para o estudo da resistência cruzada de populações de *P. oryzae* do trigo a piraclostrobina foram utilizados 16 isolados provenientes de amostragens populacionais realizadas em lavouras de trigo em Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, no ano de 2012. Os isolados de *P. oryzae* foram previamente genotipados para o gene *cyt b*. O nível de resistência à piraclostrobina foi determinado com base na EC_{50} dos isolados de *P. oryzae*. Os valores de EC_{50} foram determinados para dois grupos de isolados (Tabela 2): a) oito isolados QoI-S sensíveis à azoxistrobina, todos aqueles descritos no item 3.6; b) oito isolados resistentes, todos aqueles descritos no item 3.6 e o isolado MO12.1.096. Seguiram-se os procedimentos descritos por Ma, Uddin e Olaya (2009), com modificações. A preparação dos meios de cultura, a transferência de material fúngico e a incubação foram realizadas como descrito no item 3.5. O fungicida Comet® (piraclostrobina 250 g/L, BASF) foi diluído 1:1000 em água deionizada para produzir uma solução estoque. O meio de cultura BDA foi autoclavado e resfriado à 55°C e, em seguida, foi acrescentado 80 µg/mL de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e de solução estoque do fungicida piraclostrobina para atingir as concentrações finais de 0,0000; 0,0025; 0,0049; 0,0098; 0,0195 e 0,6250 µg/mL de ingrediente ativo. Cada unidade experimental constituiu-se de uma placa de meio de cultura contendo quatro isolados distintos de *P. oryzae*. As unidades experimentais foram repetidas quatro vezes. Foi medido o crescimento diametral (mm) das colônias desenvolvidas a 25°C por cinco dias, subtraindo-se o diâmetro do disco micelial original (5 mm). O crescimento micelial de *P. oryzae* nas diferentes doses testadas foi convertido em crescimento relativo (RG) e as concentrações do fungicida foram transformadas em logaritmo natural. Para o cálculo dos valores de EC_{50} de cada isolado, utilizou-se o programa ED50plus v1.0 (VARGAS, 2000). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e o experimento foi conduzido duas vezes. A análise de variância e o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para comparação de médias de EC_{50} de cada isolado foram efetuados utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

Tabela 2 - Origem e caracterização genética e fenotípica dos isolados de *Pyricularia oryzae*, da brusone do trigo, com resistência ou sensibilidade aos fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI).

Isolados de <i>Pyricularia oryzae</i>	Origem ^a	Haplótipos <i>cyt b</i> QoI-R ^b	Haplótipos <i>cyt b</i> QoI-S ^b	Mutação ^c
MO 12.1.237	Amambai, MS	-	H9	Gly (GGT)
MO 12.1.239	Amambai, MS	-	H9	Gly (GGT)
MO 12.1.240	Amambai, MS	-	H9	Gly (GGT)
MO 12.1.129	Amambai, MS	-	H9	Gly (GGT)
MO 12.1.130	Amambai, MS	-	H9	Gly (GGT)
MO 12.1.150	Amambai, MS	-	H9	Gly (GGT)
MO 12.1.132	Amambai, MS	-	H9	Gly (GGT)
MO 12.1.280	Amambai, MS	-	H9	Gly (GGT)
MO 12.1.146	Amambai, MS	H1	-	Ala (GCT)
MO 12.1.127	Amambai, MS	H1	-	Ala (GCT)
MO 12.1.068	Rio Verde, GO	H1	-	Ala (GCT)
MO 12.1.028	Rio Verde, GO	H1	-	Ala (GCT)
MO 12.1.030	Rio Verde, GO	H1	-	Ala (GCT)
MO 12.1.040	Patrocínio, MG	H1	-	Ala (GCT)
MO 12.1.096	Patrocínio, MG	H1	-	Ala (GCT)
MO 12.1.023	Patrocínio, MG	H1	-	Ala (GCT)

^aOrigem dos isolados de *P. oryzae*: Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), e Minas Gerais (MG).

^b*cyt b* QoI-R indicam haplótipos do gene *cyt b* resistentes a azoxistrobina e *cyt b* QoI-S indicam haplótipos sensíveis.

^cMutação que ocorre no códon 143 de glicina (G) para alanina (A) conferindo resistência a fungicidas QoI em isolados de *P. oryzae*.

Fonte: Dados da pesquisa da autora

4 RESULTADOS

4.1 VARIAÇÃO NO GENE *CYT B* E AMPLA DISTRIBUIÇÃO DO ALELO QoI-R

Um fragmento de 510 pb foi amplificado com sucesso de 325 isolados de *P. oryzae*, 198 isolados de trigo e 91 isolados de outras espécies de plantas poáceas em campos amostrados em 2012, e 36 isolados de trigo amostrados em 2005. O sequenciamento do *cyt b* distinguiu nove haplótipos, dos quais quatro (H1 a H4) continham a transição G para C no códon 143 (que resulta na mudança G143A) ligados ao fenótipo de resistência QoI-R. Nenhum haplotipo apresentou a transversão de C para A no códon 129 (mutação F129A) (Figura 1). O haplotipo H1 (resistente à QoI; QoI-R) foi o haplotipo predominante. O haplotipo H1 esteve presente em 70,4% dos isolados (229 isolados no total, sendo 191 isolados de trigo e 38 isolados de outras plantas poáceas). Já, o H9 (sensível a QoI, QoI-S) foi o segundo haplotipo predominante e esteve presente em 20,3% dos isolados (66 isolados no total, sendo 42 isolados de trigo e 24 isolados de outras plantas poáceas). Os outros sete haplótipos (de H2 a H8) foram detectados apenas em isolados derivados de outras plantas poáceas. Entre os 289 isolados recuperados em 2012, 90,4% dos isolados derivados de trigo e 48,4% derivados de outras plantas poáceas tiveram a substituição G143A. Apenas 36,1% dos isolados recuperados em 2005 mostraram esta mutação (Tabela 3).

Figura 1 - Sítios polimórficos na sequência do gene citocromo b (*cyt b*) a partir de 325 isolados de *Pyricularia oryzae* do Brasil^a.

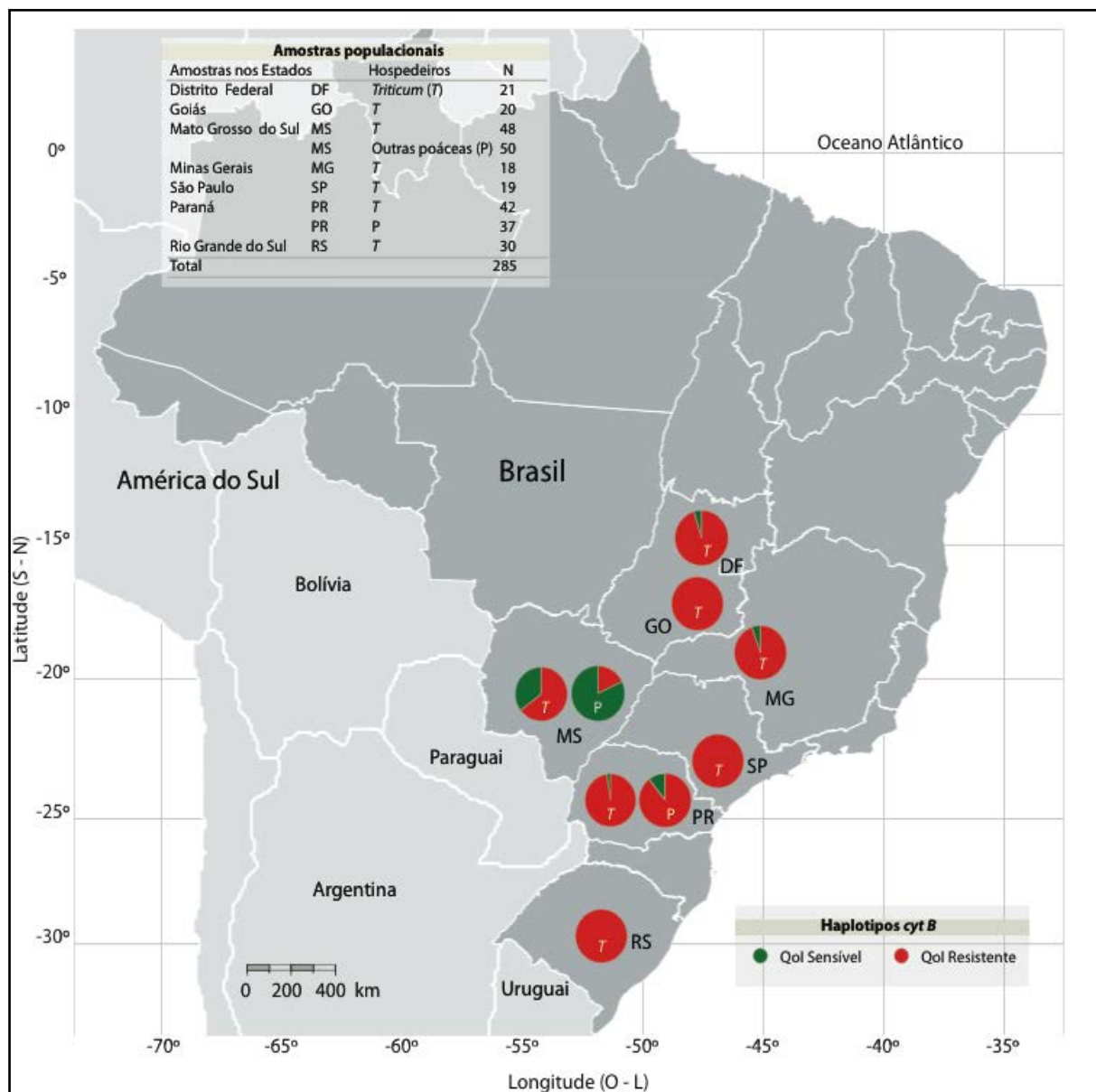
Fenótipo	Código no NCBI	Haplotipos	Posição											6	9	7	0	Número do sítio																																	
				1	2	3	4	4	5	6	6	6	9					7	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	5					
				8	4	6	0	2	7	0	-	6	9					7	6	0	7	6	1	3	7	2	1	0	8	7	5	1	2	0	6	5	1	4	0	0	0	1	1	3	5	8	9	0	4	9	0
				8	4	6	0	2	7	0	-	6	9					7	6	0	7	6	1	3	7	2	1	0	8	7	5	1	2	0	6	5	1	4	0	0	0	1	1	3	5	8	9	0	4	9	0
Frequência de haplotipos				1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4								
				Tipo de sítio e de carácter																																															
<i>Triticum</i>		Outras Poaceae	v	v	v	v	t	t	t	v	t	t	v	t	t	t	t	v	v	t	t	v	t	v	v	v	v	t	t	t	v	t	v	t	v	v	v	v	t	t	t	t									
			i	-	i	i	i	i	-	-	i	i	i	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	-	i	i	-	i	i	i	i	i	i	i									
Qol-S	AY245424	Tipo selvagem	cyt b (do arroz)	-	T	T	T	A	T	C	C	G	G	T	A	G	G	T	C	T	T	G	T	T	T	C	T	T	T	T	A	C	T	C	T	C	T	A	T	T	T	A	C								
Qol-R	AY245426	Mutação F129L	-	-	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
	AY245427	Mutação G143A	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
	KM023775	H1	191	38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
	KM023778	H2	-	1	A	.	A	C	T	C	.	T	C	C	A	.	.	T	A	.	A	.	A	.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	A	.	A	A	.	G	.	.	.	.								
	KM023776	H3	-	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.							
	KM023777	H4	-	4	A	.	A	C	T	C	.	T	A	C	C	A	.	.	T	A	.	A	.	A	.	.	A	C	A	.	T	T	C	.	A	T	A	.	A	A	.	G	T	.							
Total Qol-R				191	44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.						
Qol-S	KM023779	H5	-	1	A	.	A	C	T	.	.	.	.	C	T	A	A	A	.	A	A	C	T	A	C	A	A	T	T	.	.	A	.	A	C	A	A	C	A	C	A	C	A								
	KM023780	H6	-	8	A	.	A	C	T	.	.	.	.	C	T	A	.	A	.	A	.	A	A	C	T	A	C	A	A	T	T	.	.	A	.	A	C	A	A	C	A	C	A								
	KM023781	H7	-	10	A	G	A	C	T	C	T	.	T	A	.	C	.	.	A	C	A	.	A	.	A	.	A	.	T	T	.	T	A	A	C	A	A	.	A	.	.	.	.								
	KM023782	H8	-	4	A	.	A	C	T	C	.	T	A	.	C	A	.	.	T	A	.	A	.	A	.	.	A	C	A	.	T	T	C	.	A	T	A	.	A	A	.	G	T	.							
	KM023783	H9	43	24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
Total Qol-S				43	47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							

^aAs três primeiras sequências foram baixadas a partir do banco de dados do NCBI como referências (KIM et al. 2003): alelo tipo selvagem QoI sensível (QoI-S) de isolados de *P. oryzae* recuperados de arroz (AY245424); mutação F129L para resistência a QoI (QoI-R), com sequência de referência AY245426 recuperado de *Lolium perenne* mostrando a transversão de C para A no códon 129; mutação G143A QoI-R, com sequência de referência AY245427 (também de *L. perenne*) que mostra a transição de G para C no códon 143. Os números no topo do alinhamento referem-se à posição de nucleotídeo no fragmento de PCR alinhados (comprimento total de 510 pb). Colunas retangulares cinzas indicam mutações da sequência *cyt b* nas posições F129L (base 66) e G143A (base 107).

Fonte: Dados da pesquisa da autora

Os isolados obtidos de amostras de trigo aqui examinados foram representativos de populações de *P. oryzae* de sete Estados brasileiros: Distrito Federal (DF; 21 isolados), Goiás (GO, 20 isolados), Minas Gerais (MG, 18 isolados), Mato Grosso do Sul (MS, 48 isolados), Paraná (PR, 42 isolados), Rio Grande do Sul (RS, 30 isolados) e São Paulo (SP, 19 isolados). As regiões com o maior percentual de isolados que mostram a mutação G143A para resistência foram GO, RS e SP, com 100%; seguido pelo PR com 97,6%; DF com 95,2% e MG com 94,4% das amostras. Mato Grosso do Sul foi a região com o menor percentual de isolados com a mutação QoI-R (64,6%) (Tabela 3, Figura 2). Os isolados obtidos de amostras de outras plantas poáceas representavam as populações de *P. oryzae* do MS (50 isolados) e do PR (37 isolados). Entre os isolados do MS, 18% tinham a mutação QoI-R, enquanto entre os isolados do PR, 89,2% tinham a mutação QoI-R. Um único isolado de cada uma das quatro regiões (DF, GO, MG e RS) estava disponível para a genotipagem do *cyt b*. Os isolados do DF e MG mostraram haplótipos resistentes a *cyt b* (haplótipos H1 e H2, respectivamente), e para os isolados de GO e RS, o haplótipo sensível H9 (Tabela 3, Figura 2).

Figura 2 - Distribuição geográfica de isolados de *Pyricularia oryzae*, amostrados de trigo e de outras espécies de plantas poáceas dentro de campos de trigo, que carregam o alelo GCT (●) QoI resistente ou o alelo GGT (●) QoI sensível do gene *cyt b*, associados com a resistência ou a sensibilidade aos fungicidas QoI, respectivamente^a.



^aEm Mato Grosso do Sul e Paraná, T e P representa isolados derivados de *Triticum aestivum* e de outras plantas poáceas, respectivamente.

Fonte: Dados da pesquisa da autora

Tabela 3 - Caracterização genética e fenotípica de populações de *Pyricularia oryzae* para resistência a fungicidas QoI por análise da sequência do gene *cyt b* e sensibilidade a azoxistrobina^a.

Populações e ano de amostragem	N	Mutação ^b GCT (A)	Haplótipos ^c <i>cyt b</i> -R	GMMs ^d	Mutação ^b GGT (G)	Haplótipos ^c <i>cyt b</i> -S	GMMs ^d	Isolados resistentes (%)
<i>Triticum aestivum</i> , 2005								
Centro-Sul do Brasil	36	13	H1	13	23	H9	23	36,1
<i>Triticum aestivum</i> , 2012								
Distrito Federal	21	20	H1	9	1	H9	n.d. ^d	95,2
Goiás	20	20	H1	9	0			100
Minas Gerais	18	17	H1	10	1	H9	n.d.	94,4
Mato Grosso do Sul	48	31	H1	19	17	H9	11	64,6
Paraná	42	41	H1	37	1	H9	n.d.	97,6
Rio Grande do Sul	30	30	H1	14	0			100
São Paulo	19	19	H1	18	0			100
Total	198	179		104	19		11	90,4
Outras espécies de plantas poáceas, 2012								
Distrito Federal	1	1	H1	1	0			
Goiás	1	0			1	H9	1	
Minas Gerais	1	1	H2	1	0			
Mato Grosso do Sul	50	9	H1 (7) H4 (2)	7 2	41	H5 (1) H6 (6) H7 (9) H8 (3) H9 (22)	1 6 7 3 13	18
Paraná	37	33	H1 (30) H3 (1) H4 (2)	20 1 1	4	H6 (2) H7 (1) H8 (1)	2 1 1	89,2
Rio Grande do Sul	1	0			1	H9		
Total	91	44		27	47		33	48,4

^aUm fragmento de 510 pb foi amplificado com sucesso de 325 isolados de *P. oryzae*: 198 derivados do trigo e 91 de outras espécies de plantas poáceas amostrados em 2012, e 36 isolados de trigo amostrados em 2005.

^bNúmero de isolados que mostram tanto a mutação GCT (A) ou CCT (G) na posição 106 do fragmento de PCR amplificado a partir do gene *cyt b*.

^c*cyt b*-R indica haplótipos do gene citocromo b (*cyt b*) resistentes aos fungicidas QoI enquanto *cyt b*-S indicam haplótipos sensíveis.

^dOs dados dos GMMs a partir de isolados derivados de *T. aestivum* obtidos em 2005 foram os de Maciel et al. (2014). GMM dos isolados obtidos em 2012, foram determinados como descrito por Pereira et al. (2014).

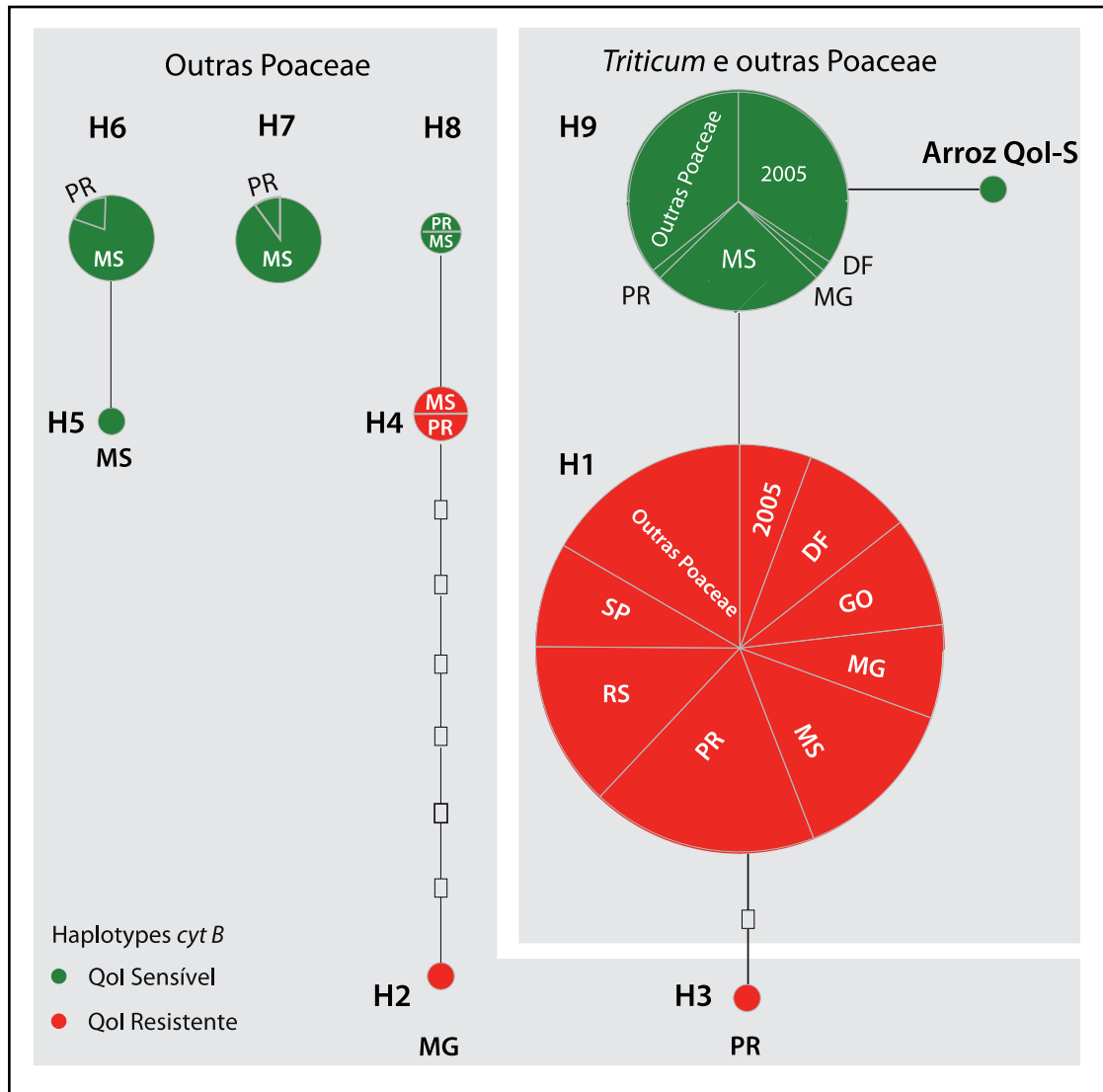
^en.d. = não determinado.

Fonte: Dados da pesquisa da autora

As sequências do haplotipo H1(QoI-R) do *cyt b* obtidas a partir de isolados de *P. oryzae* de campos de trigo deste estudo mostraram 100% de similaridade com a sequência do *cyt b* contendo a mutação G143A obtidos de isolados de *P. oryzae* recuperados de *Lolium perenne* (KIM et al., 2003). Do mesmo modo, a sequência do haplotipo H9 (QoI-S) do *cyt b* foi idêntica à do tipo selvagem *Lolium* (KIM et al., 2003). Por outro lado, as sequências do *cyt b* de todos os 325 isolados examinados aqui diferia da sequência obtida do isolado de *P. oryzae* derivado de arroz por uma transição de T para A na posição 356 do alinhamento [posição 949 na sequência original (KIM et al., 2003)], o que produziria uma alteração de aminoácido de Phe para Tyr (Figura 2).

A análise da relação entre os nove haplótipos do *cyt b* por parcimônia estatística revelou três redes e um haplotipo QoI-S individual (H7) de amostras derivadas de outras plantas poáceas que não puderam ser ligados a qualquer outro haplotipo detectado. Duas das redes foram formadas exclusivamente por haplótipos encontrados em amostras derivadas de outras plantas poáceas. A primeira rede ligou aos haplótipos H5 e H6. A segunda rede ligou o haplotipo QoI-S H8 com o haplotipo QoI-R H4 que, posteriormente, ligou-se ao haplotipo QoI-R H2 por sete passos mutacionais não detectados. A terceira rede continha haplótipos compartilhados por outras plantas poáceas (H3) e amostras de derivados de trigo (H1). Os haplótipos mais frequentemente detectados H1 (QoI-R) e H9 (QoI-S) foram ligados por um passo mutacional. Da mesma forma, o haplotipo H9 foi ligado por um passo mutacional ao haplotipo *cyt b* sensível de referência obtido dos isolados de arroz (KIM et al., 2003). Além disso, H1 foi ligado a H3 (haplotipo QoI-R exclusivo de outras plantas poáceas) por dois passos mutacionais (Figura 3).

Figura 3 - Redes de haplótipos do gene *cyt b* de isolados de *Pyricularia oryzae* derivados de *Triticum* e de outras plantas poáceas^a.



^a A área de cada círculo é proporcional ao número de isolados amostrados em cada haplótipo. Os haplótipos são ligados por segmentos de linha que representam um único passo mutacional cada. Os círculos vermelhos representam haplótipos resistentes (R) a QoI e círculos verdes representam haplótipos sensíveis (S) a QoI. Os quadrados brancos representam haplótipos não amostrados. Haplótipos *cyt b* estão apresentados na parte lateral de cada nó. Haplótipos H5 - H6, H7, ou H8 - H4 - H2 não estão ligados à rede maior de *Triticum*, pois ultrapassou o limite de 95% de conexão por parcimônia.

Fonte: Dados da pesquisa da autora

4.2 MÚLTIPLAS ORIGENS PARA OS HAPLÓTIPOS *CYT B* QoI-R

Dos dois haplótipos QoI-R mais frequentes do *cyt b*, o H1 (QoI-R) foi observado em vários genótipos multiloci microssatélites (GMM) distintos do fungo, indicando várias origens para a mutação *cyt b* conferindo resistência a fungicidas QoI. Entre os 36 GMMs de *P. oryzae* detectados em 2005, 13 GMMs eram exclusivamente QoI-R e 23 GMMs eram exclusivamente QoI-S. Entre os isolados de trigo de 2012, 102 GMMs foram QoI-R, nove eram apenas QoI-S, e dois GMMs tinham *cyt b* QoI-S ou mutações QoI-R. Nos isolados derivados de outras espécies de plantas poáceas, 27 GMMs eram apenas QoI-R, 30 GMMs eram QoI-S e três GMMs tinham *cyt b* QoI-S ou mutações QoI-R. Cinco GMMs foram compartilhados entre as populações derivadas de trigo e de outras plantas poáceas, dos quais dois eram QoI-R, um QoI-S, e um QoI-R ou QoI-S (Tabela 3).

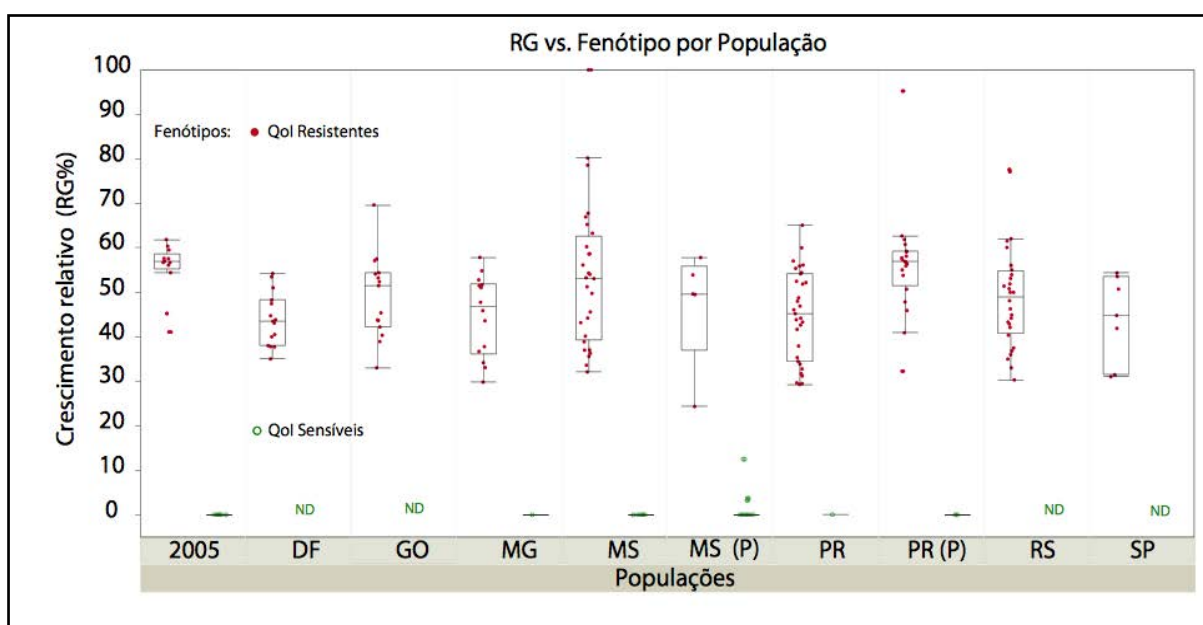
4.3 TESTE *IN VITRO* PARA SENSIBILIDADE AO FUNGICIDA QoI

Os isolados de *P. oryzae* apresentaram reação fenotípica diferencial e também variação quantitativa em resposta à adição de azoxistrobina ao meio de cultura (Figura 4). A ocorrência de crescimento micelial fúngico foi interpretado como resistência ao fungicida (QoI-R), a qual assumiu-se ter resultado da presença da mutação G143A no gene *cyt b*. O teste de sensibilidade “*in vitro*” com um total de 249 isolados de *P. oryzae*, 156 isolados de trigo e 58 isolados de outras plantas poáceas amostrados em 2012 e 35 isolados de trigo amostrados em 2005, indicaram uma completa correlação entre a resposta fenotípica e condição genotípica do *cyt b* QoI-S ou QoI-R. Observou-se, também, variação quantitativa do nível de resistência a azoxistrobina entre os isolados que carregam a mutação G143A para QoI-R (Tabela 4, Figuras 4 e 5).

Além disso, examinando-se a variação da resistência a azoxistrobina (em 10 µg/mL de i.a.) de um subgrupo de 83 isolados de *P. oryzae* (54 derivados de trigo e 29 derivados de outras plantas poáceas), observou-se que 31 isolados de trigo e 16 isolados de outras plantas poáceas que cresceram na presença de fungicida QoI (fenótipo QoI-R) variaram quanto ao nível de sensibilidade à azoxistrobina (F_{isolados} significativo para valores de crescimento relativo (RG), $P < 0,0001$ para ambas repetições dos experimentos, Tabela 4). Entre os isolados derivados de trigo, o RG variou de 41% a 67% entre os isolados amostrados em 2005, de 23% a 69% entre os isolados amostrados em 2012 e de 49% a 62% entre os isolados derivados de outras plantas poáceas. A correlação entre os resultados dos dois

experimentos foi positiva e significativa ($R = 0,86$, $P < 0,0001$ para os experimentos com amostras derivadas de trigo; e $R = 0,91$, $P < 0,0001$, para os dois experimentos com amostras derivadas de outras plantas poáceas). O teste exato de Fisher - DMS não discriminou os isolados de *P. oryzae* resistentes a azoxistrobina em grupos fenotípicos claramente distinguíveis; no entanto, ele separou claramente isolados QoI-R de isolados QoI-S que apresentaram RGs = 0 (Tabela 4).

Figura 4 - Distribuição *boxplot* do nível de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pyricularia oryzae* ao fungicida QoI azoxistrobina^{a, b, c}.



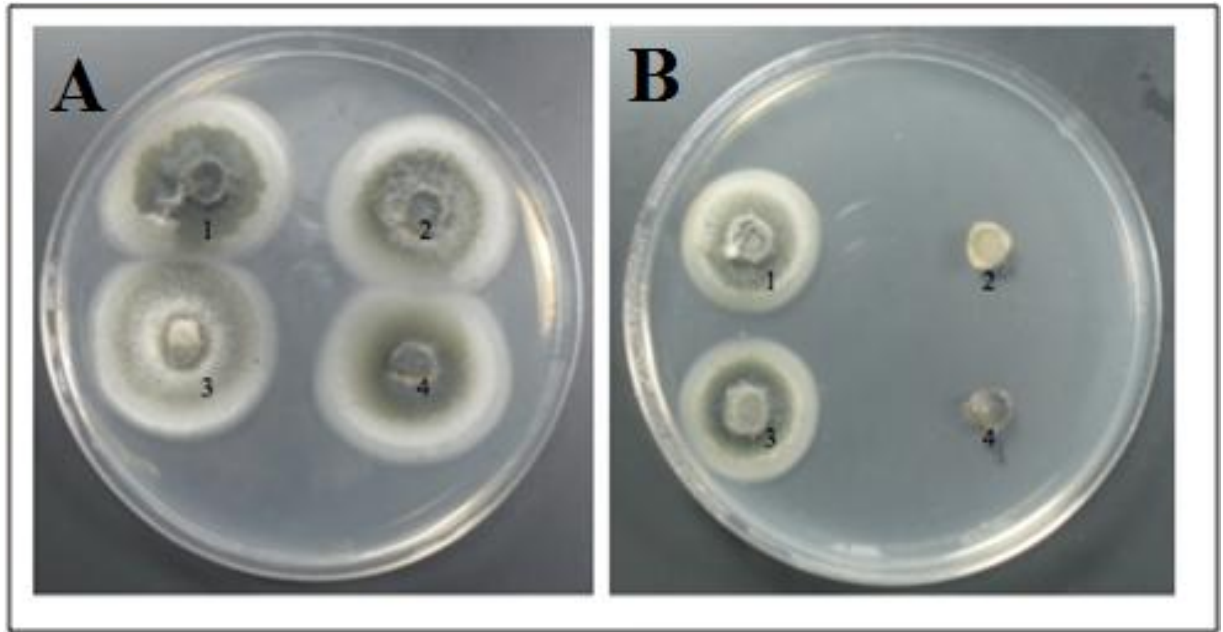
^aO crescimento relativo fúngico foi determinado com base na razão entre o crescimento diametral dos isolados após cinco dias de incubação em BDA com ou sem 10 µg/mL de azoxistrobina.

^b2005 – Isolados do Centro-Sul do Brasil amostrados no ano de 2005; DF, GO, MG, MS, PR, RS e SP contêm isolados derivados de trigo amostrados em 2012; MS-P e PR-P contêm isolados derivados de outras plantas poáceas.

^cQoI-R (●) = isolados com QoI G143A alelo resistente ao gene *cyt b* e QoI-S (●) = isolados com QoI alelo sensível (tipo selvagem).

Fonte: Dados da pesquisa da autora

Figura 5 - Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pyricularia oryzae* ao fungicida QoI azoxistrobina.



A: Isolados de *Pyricularia oryzae* crescendo em BDA com 0 $\mu\text{g/mL}$ de azoxistrobina e 80 $\mu\text{g/mL}$ de SHAM.

B: Isolados de *Pyricularia oryzae* crescendo em BDA com 10 $\mu\text{g/mL}$ de azoxistrobina e 80 $\mu\text{g/mL}$ de SHAM.

Isolados 1 (Py70.4) e 3 (Py79.3) tem haplotipo H1 *cyt b* (QoI-R), e os isolados 2 (Py74.5) e 4 (Py86.1) tem o haplotipo H9 *cyt b* de QoI-S.

Fonte: Dados da pesquisa da autora

Tabela 4 - Caracterização fenotípica de isolados de *Pyricularia oryzae* para resistência a fungicidas QoI em experimento de sensibilidade *in vitro*^a.

População, ano de amostragem e isolados	Crescimento relativo (RG) em BDA com 10 µg/mL de azoxistrobina				Haplotipo ^b <i>cyt b</i>
	Média do experimento 1	Desvio padrão	Média do experimento 2	Desvio padrão	
<i>Triticum aestivum</i> , 2005					
Isolados QoI-R					
Py48.1	67,28	(± 6,18)	56,83	(± 3,19)	H1
Py41.4	63,89	(± 4,39)	57,05	(± 4,75)	H1
Py6025	62,50	(± 2,85)	56,30	(± 1,57)	H1
Py33.1	62,18	(± 4,49)	50,20	(± 4,05)	H1
Py53.1	61,31	(± 5,42)	53,08	(± 1,89)	H1
Py47.1	60,44	(± 6,80)	54,40	(± 3,19)	H1
Py79.3	59,34	(± 3,46)	54,13	(± 2,64)	H1
Py46.2	59,32	(± 8,01)	55,93	(± 5,51)	H1
Py91.1	58,74	(± 7,68)	55,61	(± 2,82)	H1
Py70.4	56,63	(± 7,11)	51,95	(± 2,82)	H1
Py30.2	56,16	(± 1,43)	59,20	(± 3,16)	H1
Py67.3	45,60	(± 11,00)	46,16	(± 3,29)	H1
Py53.4	41,09	(± 3,62)	41,26	(± 4,59)	H1
Isolados QoI-S					
Py19.1	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py2.1	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py20.3	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py21.3	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py22.2	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py25.1	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py35.1	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py5003	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py5007	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py5038	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py5045	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py5046	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py6018	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py6038	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py75.4	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py86.1	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py96.2	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
Py97.1	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
<i>Triticum aestivum</i> , 2012					
Isolados QoI-R					
MO.12.1.219	69,95	(± 5,15)	50,37	(± 1,70)	H1

MO.12.1.243	65,66	(± 8,22)	55,88	(± 4,67)	H1
MO.12.1.028	61,75	(± 8,57)	52,29	(± 3,78)	H1
MO.12.1.147	60,89	(± 4,37)	56,39	(± 3,29)	H1
MO.12.1.001i	57,04	(± 6,98)	55,51	(± 4,11)	H1
MO.12.1.148	54,90	(± 3,27)	51,58	(± 3,47)	H1
MO.12.1.134	51,67	(± 2,22)	48,74	(± 4,97)	H1
MO.12.1.020i	50,85	(± 10,55)	54,31	(± 3,93)	H1
MO.12.1.135	49,26	(± 3,67)	42,96	(± 8,63)	H1
MO.12.1.195	47,21	(± 7,24)	56,39	(± 2,65)	H1
MO.12.1.007	44,12	(± 3,11)	51,67	(± 9,13)	H1
MO.12.1.119	43,80	(± 8,48)	48,23	(± 8,51)	H1
MO.12.1.169	37,05	(± 3,87)	51,89	(± 6,05)	H1
MO.12.1.179	33,79	(± 4,51)	54,80	(± 3,72)	H1
MO.12.1.030	33,71	(± 4,93)	51,22	(± 4,87)	H1
MO.12.1.178	30,83	(± 2,22)	43,27	(± 8,23)	H1
MO.12.1.068	24,56	(± 6,57)	58,45	(± 1,58)	H1
MO.12.1.170	23,38	(± 15,58)	46,46	(± 4,72)	H1
Isolados QoI-S					
MO.12.1.177	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO.12.1.183	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO.12.1.237	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO.12.1.239	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO.12.1.240	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
DMS <i>isolados trigo</i>	8,46		5,15		
F_{isolados}	96,27	$P \leq 0,0001$	202,51	$P \leq 0,0001$	
F_{blocos}	0,87	NS	2,78	NS	
Outras espécies de plantas poáceas, 2012					
Isolados QoI-R					
MO12.0.594i	75,92	(± 19,41)	51,57	(± 4,28)	H1
MO12.0.572i	68,93	(± 10,55)	52,39	(± 2,44)	H1
MO12.0.613i	68,81	(± 11,20)	56,85	(± 9,00)	H3
MO12.0.625i	66,64	(± 10,27)	50,94	(± 2,50)	H1
MO12.0.534i	66,27	(± 5,61)	48,66	(± 7,78)	H1
MO12.0.601	65,30	(± 10,26)	54,65	(± 3,59)	H1
MO12.0.607i	62,66	(± 10,08)	51,38	(± 4,20)	H1
MO12.0.543i	62,33	(± 5,43)	55,11	(± 6,07)	H1
MO12.0.535i	62,25	(± 6,35)	53,55	(± 3,61)	H1
MO12.0.634i	62,14	(± 14,93)	61,68	(± 6,50)	H1
MO12.0.551i	57,95	(± 4,99)	58,55	(± 8,01)	H1
MO12.0.655i	57,18	(± 5,05)	56,62	(± 2,93)	H1
MO12.0.174	56,14	(± 7,17)	48,34	(± 0,97)	H1
MO12.0.056i	52,95	(± 6,54)	59,00	(± 4,70)	H1
MO12.0.578	52,47	(± 2,74)	43,42	(± 3,26)	H1
MO12.0.231	52,44	(± 8,73)	48,50	(± 3,37)	H1

Isolados QoI-S

MO12.0.146	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO12.0.144	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO12.0.212	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H6
MO12.0.222	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H6
MO12.0.232	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H8
MO12.0.321	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO12.0.322	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO12.0.337	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H7
MO12.0.347	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO12.0.368	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO12.0.555i	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H9
MO12.0.561i	0,00	(± 0,00)	0,00	(± 0,00)	H6
DMS <i>isolados de outras plantas poáceas</i>	10,59		5,88		
F_{isolados}	70,19	$P \leq 0,0001$	165,00	$P \leq 0,0001$	
F_{blocos}	3,11	NS	2,15	$P \leq 0,0112$	

^a Um total de 83 isolados de *P. oryzae* foram testados “*in vitro*” quanto à resistência aos fungicidas QoI. Quatro isolados foram testados por placa e cada placa foi replicada seis vezes. O crescimento diametral foi medido (mm) das colônias crescidas à 25°C por cinco dias, e convertidos em crescimento relativo (RG) = 100 x (diâmetro médio da colônia em meio com fungicida) / (diâmetro médio de colônias em meio sem fungicida). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso e foram conduzidos duas vezes.

^b Dados obtidos a partir da análise das sequências do gene *cyt b*.

Fonte: Dados da pesquisa da autora

4.4 DETERMINAÇÃO DA EC₅₀ PARA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA A AZOXISTROBINA

Os valores de EC₅₀ de oito isolados sensíveis a QoI variou de 0,014 ($\pm$ 0,017) a 0,076 ($\pm$ 0,053) μ g/mL de i.a. de azoxistrobina (Tabela 5), enquanto que os valores de EC₅₀ para sete isolados resistentes a QoI foram maiores do que 10 μ g/mL do fungicida (a dose mais elevada testada neste experimento, com RGs > 92% (Tabela 5). A ANOVA indicou que a interação $F_{\text{isolados} \times \text{experimentos}}$ foi não significativa ($P = 0,9471$), permitindo o agrupamento das duas réplicas dos experimentos. Não houve diferença significativa entre os isolados em relação a EC₅₀ ($P = 0,9436$).

Tabela 5 - EC₅₀ para um grupo de isolados do patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* resistentes e sensíveis a QoI¹.

EC ₅₀ (μ g/mL de azoxistrobina)			
Isolados sensíveis a QoI ²		Isolados resistentes a QoI ²	
Isolados	Média ³ (Desvio padrão)	Isolados	Média ³
MO12.1.237	0,0479 ($\pm$ 0,0299)	MO12.1.127	> 10
MO12.1.132	0,0762 ($\pm$ 0,0526)	MO12.1.146	> 10
MO12.1.240	0,0584 ($\pm$ 0,0217)	MO12.1.023	> 10
MO12.1.129	0,0142 ($\pm$ 0,0171)	MO12.1.030	> 10
MO12.1.130	0,0562 ($\pm$ 0,0313)	MO12.1.028	> 10
MO12.1.150	0,0517 ($\pm$ 0,0345)	MO12.1.068	> 10
MO12.1.239	0,0486 ($\pm$ 0,0101)	MO12.1.040	> 10
MO12.1.280	0,0663 ($\pm$ 0,0271)		
Média EC ₅₀	0,0524 ($\pm$ 0,0181)	> 10	

¹ Os experimentos de EC₅₀ foram conduzidos seguindo os mesmos procedimentos gerais do experimento de sensibilidade *in vitro* a QoI.

² Todos os isolados sensíveis a QoI testados tinham haplotipo H9 no *cyt b*, enquanto os isolados resistentes a QoI tinham haplotipo H1 no *cyt b*.

³ Média de oito repetições (combinação de dois experimentos independentes, com quatro repetições cada).

Fonte: Dados da pesquisa da autora

4.5 RESISTÊNCIA CRUZADA A PIRACLOSTROBINA

Os valores de EC_{50} de oito isolados sensíveis ao fungicida QoI azoxistrobina variaram de 0,0048 a 0,0132 $\mu\text{g/mL}$ de i.a. do fungicida piraclostrobina, enquanto que os valores de EC_{50} para os oito isolados resistentes a QoI – azoxistrobina variaram de 0,1587 a 0,5070 $\mu\text{g/mL}$ de i.a. do fungicida. A maior EC_{50} à piraclostrobina detectada para os isolados resistentes a QoI – azoxistrobina se aproximou da dose mais elevada testada neste experimento 0,6250 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6).

A análise pelo teste Scott-Knott não indicou diferença significativa entre os isolados QoI-S quanto à EC_{50} para piraclostrobina (grupo C, Tabela 6). Os isolados resistentes a azoxistrobina (QoI-R) foram também resistentes à piraclostrobina (Figuras 6 e 7, Tabela 6), confirmando nossa hipótese inicial. Entretanto, foi possível observar variação quantitativa do nível de resistência a piraclostrobina. O teste Scott-Knott discriminou os isolados de *P. oryzae* resistentes a piraclostrobina em dois grupos fenotípicos diferentes: (A) altamente resistentes e (B) resistentes (Tabela 6). A média de valores de EC_{50} para o grupo dos isolados sensíveis, que corresponde a oito isolados foi de 0,0077 ($\pm$ 0,0023) $\mu\text{g/mL}$ de piraclostrobina. Para o grupo B de isolados resistentes (cinco isolados), a média de EC_{50} foi de 0,2094 ($\pm$ 0,0293) $\mu\text{g/mL}$ de piraclostrobina. O grupo de isolados altamente resistentes (A), composto de três isolados, apresentou média de EC_{50} de 0,5059 ($\pm$ 0,0013) $\mu\text{g/mL}$ de piraclostrobina.

Tabela 6 - Valores médios de EC₅₀ à piraclostrobina detectados para isolados sensíveis (QoI-S) e para isolados resistentes (QoI-R) ao fungicida inibidor da quinona oxidase de *Pyricularia oryzae* do trigo¹.

EC ₅₀ (µg/mL de piraclostrobina)					
Isolados sensíveis a QoI ²			Isolados resistentes a QoI ²		
Isolados	Média ^{3,4} (Desvio padrão)		Isolados	Média ^{3,4} (Desvio padrão)	
MO12.1.132	0,0048 (± 0,0038)	C	MO12.1.023	0,2478 (± 0,0675)	B
MO12.1.129	0,0072 (± 0,0027)	C	MO12.1.030	0,2168 (± 0,0394)	B
MO12.1.130	0,0132 (± 0,0037)	C	MO12.1.096	0,1587 (± 0,0230)	B
MO12.1.150	0,0085 (± 0,0020)	C	MO12.1.127	0,2019 (± 0,0414)	B
MO12.1.237	0,0068 (± 0,0058)	C	MO12.1.146	0,2217 (± 0,0588)	B
MO12.1.239	0,0059 (± 0,0009)	C	MO12.1.028	0,5065 (± 0,1842)	A
MO12.1.240	0,0080 (± 0,0035)	C	MO12.1.040	0,5070 (± 0,2613)	A
MO12.1.280	0,0074 (± 0,0013)	C	MO12.1.068	0,5040 (± 0,2309)	A
Média EC ₅₀	0,0077 (± 0,0023)			0,3205 (± 0,1454)	

¹Os experimentos de EC₅₀ foram conduzidos seguindo os mesmos procedimentos gerais do experimento de sensibilidade *in vitro* a QoI.

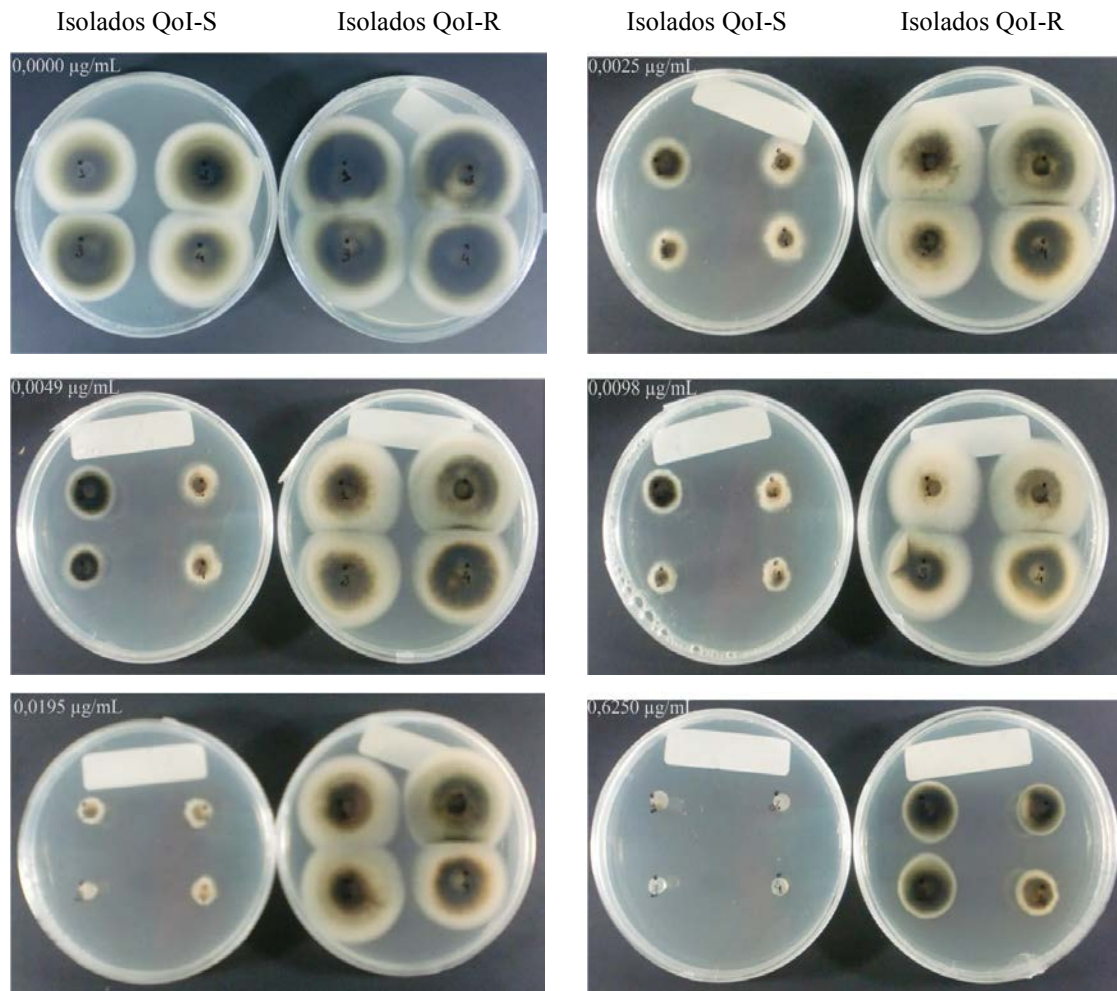
²Todos os isolados sensíveis a QoI testados tinham haplotipo H9 no *cyt b*, enquanto os isolados resistentes a QoI tinham haplotipo H1 no *cyt b*.

³Média de oito repetições (combinação de dois experimentos independentes, com quatro repetições cada).

⁴Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa da autora

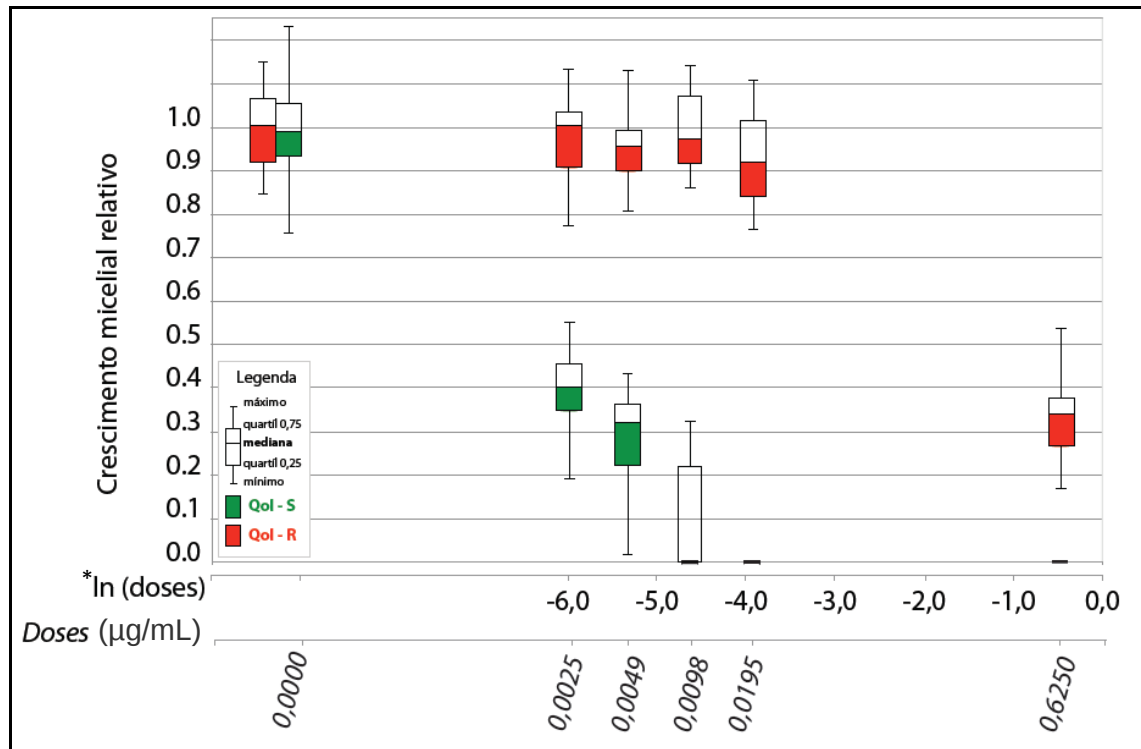
Figura 6 - Sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Pyricularia oryzae* do trigo sensíveis (QoI-S) e resistentes (QoI-R) ao fungicida inibidor da quinona oxidase (QoI) piraclostrobina.



*Concentrações utilizadas no experimento: 0; 0,0025; 0,0049; 0,0098; 0,0195 e 0,06250 µg/mL com 80 µg/mL de ácido salicilhidroxâmico (SHAM).

Fonte: Dados da pesquisa da autora

Figura 7 – Crescimento micelial relativo médio de oito isolados sensíveis (QoI-S) e de oito isolados resistentes (QoI-R) de *Pyricularia oryzae* do trigo, ao fungicida inibidor da quinona oxidase (QoI) em diferentes doses do fungicida piraclostrobina.



*ln (doses) – Doses transformadas em logaritmo.

**Concentrações utilizadas no experimento: 0; 0,0025; 0,0049; 0,0098; 0,0195 e 0,6250 µg/mL com 80 µg/mL de ácido salicílicohidroxâmico (SHAM). Média de oito repetições (combinação de dois experimentos independentes com quatro repetições cada).

Fonte: Dados da pesquisa da autora

5 DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo em profundidade para descrever a ocorrência e a distribuição generalizada da resistência aos fungicidas QoI em populações do patógeno *P. oryzae* da brusone em trigo e em outras espécies de plantas poáceas adjacentes a campos de cultivo. O haplotipo QoI-R H1 do *cyt b* predominou em todas as principais áreas de cultivo de trigo no centro-sul do Brasil. A frequência de haplótipos *cyt b* QoI-R nos campos de trigo tiveram um aumento considerável de 2,5 vezes em sete anos, variando de 36% em 2005 para 91% em 2012. Além disso, os experimentos de dose resposta indicaram que enquanto os isolados sensíveis tipo selvagem tiveram uma média de EC_{50} de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de azoxistrobina, os isolados resistentes mostraram uma $EC_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ de azoxistrobina. Portanto, a presença da mutação G143A no gene *cyt b* resultou em isolados de *P. oryzae* 200 vezes mais resistentes aos fungicidas QoI que os isolados do tipo selvagem. Esses altos níveis de resistência ao QoI, bem como a sua ampla distribuição em todas as áreas de cultivo de trigo no país, podem ser o resultado de uma alta pressão de seleção exercida por anos consecutivos de aplicações de estrobilurinas para o manejo das doenças do trigo, que ocorre há pelo menos 15 anos no Brasil (MACIEL, 2011; MACIEL et al., 2014). Assim, a resistência as estrobilurinas é provavelmente o principal fator que explica a falta de eficácia associada com o uso de fungicidas QoI para o manejo da brusone do trigo (CRUZ et al., 2010; DUVEILLER; HODSON; TIEDMANN, 2010). Cenários semelhantes foram propostos para outros patossistemas tais como *Mycosphaerella graminicola* em trigo, *Pyricularia grisea* em azevém e *Rhizoctonia solani* em arroz (OLAYA et al., 2012; TORRIANI et al., 2008; VINCELLI; DIXON, 2002).

Os haplótipos *cyt b* QoI-R foram também detectados em 48% dos isolados de *P. oryzae* derivados de outras plantas poáceas. Pelo menos um isolado de cada uma das outras espécies de plantas poáceas amostradas em campos de trigo carregava o haplotipo QoI-R H1 do *cyt b*. Em Mato Grosso do Sul, o haplotipo QoI-R H1 predominou em isolados obtidos de *Urochloa* spp., enquanto que no Estado do Paraná foi predominantemente em isolados recuperados de *Urochloa* spp. e *Chloris distichophylla*. Além disso, a rede de haplótipos *cyt b* de *P. oryzae* indicou que o haplotipo QoI-R H3 (exclusivamente encontrado em isolados derivados de outras plantas poáceas) parece ter se originado do haplotipo mais comum QoI-R H1, que foi compartilhado entre os isolados derivados de trigo e de outras plantas poáceas. Todos estes resultados indicam que outras espécies de plantas poáceas adjacentes a campos de trigo podem ser um importante reservatório do patógeno contribuindo como inóculo QoI-R

para as fases iniciais da epidemia da brusone, como anteriormente sugerido por Urashima e Kato (1998).

Além disso, isolados de *P. oryzae* carregando haplótipos QoI-R do *cyt b* foram observados em vários genótipos GMM distintos do fungo (n = 104 GMM derivados de trigo e n = 27 derivados de outras plantas poáceas). Esta descoberta pode inicialmente indicar que a resistência ao fungicida azoxistrobina emergiu por diversos eventos independentes (ou seja, por evolução paralela intraespecífica) e que os haplótipos QoI-R do *cyt b* que compõem as populações atuais de *P. oryzae* no Brasil tiveram origens distintas. Embora plausível, o processo de evolução paralela intraespecífica relatado para outros fungos fitopatogênicos (CHEN et al., 2007; TORRIANI et al., 2008), não seria a explicação mais simples para a emergência de múltiplas mutações independentes no gene *cyt b* para resistência a QoI em *P. oryzae*. Alternativamente, outros dois processos poderiam explicar melhor a origem independente múltipla de QoI-R: a) A herança uniparental sexual das mitocôndrias resistentes aos fungicidas QoI durante a reprodução sexual entre os isolados QoI-R e QoI-S. Na verdade, um modo reprodutivo misto (que inclui tanto a recombinação sexual e a dispersão clonal) moldou a estrutura genética de *P. oryzae* no Brasil (CERESINI, 2011; MACIEL et al., 2014); b) Alternativamente, anastomose (ou seja, a fusão de hifas) entre isolados QoI-S e QoI-R poderia ter contribuído para a transferência do alelo *cyt b* QoI-R entre estirpes geneticamente diversas, como foi recentemente descrito por Ávila-Adame (2014). De acordo com Ávila-Adame (2014) a fusão de hifas entre dois isolados de *P. oryzae* resultou na transferência da característica da resistência aos fungicidas QoI por anastomose. Esse processo permitiu mistura de citoplasma, migração de núcleos e herança mitocondrial biparental na formação de heterocário e heteroplasmia.

Mikaberidze, McDonald e Bonhoeffer (2013) propuseram que o custo adaptativo da resistência à fungicidas é um parâmetro crucial para determinar o resultado da competição entre as estirpes sensíveis e resistentes do patógeno e para avaliar a utilidade da mistura de fungicidas. Se não houver custo adaptativo, então a utilização do fungicida de alto risco em mistura pode selecionar para a resistência ao fungicida e, eventualmente, o fungicida de alto risco se torna não funcional. Se existir um custo adaptativo para a resistência, então uma proporção ideal do fungicida na mistura pode ser utilizada, onde se espera que a seleção para as linhagens resistentes desapareçam e o nível de controle da doença seja otimizado.

A ação mais adequada para o manejo da ocorrência em grande escala e para os elevados níveis de resistência detectados seria a remoção da pressão da seleção de fungicidas QoI sobre as populações do patógeno da brusone do trigo (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al.,

2008; GISI et al.; 2002). Se a pressão da seleção de fungicidas QoI fosse removida, no caso de um alto custo adaptativo associado com a aquisição da resistência a QoI, poderíamos prever que as populações de *P. oryzae* voltariam aos seus níveis sensíveis originais (HOBBELEN; PAVELEY; VAN DER BOSCH, 2014). No entanto, mutantes de *P. oryzae* resistentes a QoI (com as mutações G143A e G143S) eram estáveis e não apresentaram custo adaptativo. Nenhum dos mutantes apresentou reversão para a sensibilidade a azoxistrobina após três ciclos consecutivos de reprodução do patógeno na ausência de azoxistrobina (KIM et al., 2003). Sob tal cenário "sem retorno", apenas estratégias anti-resistência deveriam ter sido recomendadas (como a mistura/formulação de um fungicida de baixo risco e um fungicida de alto risco para retardar o aparecimento de resistência ao fungicida de alto risco) (HOBBELEN; PAVELEY; VAN DER BOSCH, 2014). Atualmente, a longevidade desses fungicidas tem sido desafiada pela seleção de populações de fungos resistentes as altas doses de QoIs.

Além disso, foi detectada resistência cruzada para os fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina. Todos os isolados de *P. oryzae* do trigo sensíveis à azoxistrobina (QoI-S) foram também sensíveis à piraclostrobina confirmando nossa hipótese inicial, de que a resistência a azoxistrobina resultou em resistência cruzada a piraclostrobina.

A média da EC_{50} para a combinação de todos os oito isolados resistentes foi de $0,3205 (\pm 0,1454) \mu\text{g/mL}$ de piraclostrobina. Portanto, a presença da mutação G143A no gene *cyt b* possibilitou, em média, que os isolados de *P. oryzae* fossem 42 vezes mais resistentes à piraclostrobina. Para efeito de comparação com o fungicida QoI - azoxistrobina, a EC_{50} média para azoxistrobina detectada em isolados *cyt b*-R de *P. oryzae* foi 200 vezes maior que em isolados *cyt b*-S. Apesar da diferença em magnitude entre a resistência de *P. oryzae* à piraclostrobina e à azoxistrobina, cerca de cinco vezes menor, os níveis de resistência observados são consideravelmente altos. Esses altos níveis de resistência a fungicidas QoI podem ser o resultado de elevada pressão de seleção exercida pelos anos consecutivos de aplicações de estrobilurinas para o manejo de doenças do trigo no Brasil (MACIEL, 2011; MACIEL et al., 2014).

Casos de resistência cruzada entre fungicidas estrobilurinas foram relatados para vários patossistemas em que a resistência havia sido detectada. Em isolados de campo de *Mycosphaerella fijiensis*, causando a Sigatoka negra da banana, a resistência cruzada foi observada entre todos os inibidores da Q_O , incluindo trifloxistrobina, azoxistrobina, famoxadone, estrobilurinas B e myxothiazol (SIEROTZKI et al., 2000). Em *Microdochium nivale* e *M. majus* que atacam cereais, foi observada resistência cruzada positiva entre todas as

estrobilurinas testadas no estudo: azoxistrobina, trifloxistrobina, crezoximetila, picoxistrobina e famoxadone (WALKER et al., 2009). Em áreas de pepino no Japão, Ishii et al. (2001) relataram resistência cruzada entre azoxistrobina e crezoximetila para oídio (*Podosphaera fusca*) e míldio (*Pseudoperonospora cubensis*).

Apesar do alto risco para emergência de resistência atribuído aos fungicidas QoI (FRAC, 2013), argumentos, certamente questionáveis, indicavam dificuldade em prever o período de tempo para o desenvolvimento de resistência a estrobilurinas, pois este dependeria de inúmeros fatores associados à complexidade de cada patossistema em particular. Os seguintes fatores foram citados: a) a capacidade inerente das populações de fungos fitopatogênicos em desenvolver resistência (variabilidade genética); b) a biologia do patógeno (especialmente sua taxa de reprodução); c) a magnitude da pressão de seleção (diretamente relacionada ao número de aplicações de fungicidas na cultura); d) a frequência da adoção de estratégias anti-resistência a fungicidas (como o uso de misturas e alternâncias de fungicidas em relação ao uso de princípios ativos isoladamente); e) a qualidade da cobertura da cultura na aplicação do fungicida; f) a velocidade de degradação do fungicida (que é dependente das variações climáticas locais), (MA; UDDIN; OLAYA, 2009). Entretanto, apesar da imprevisibilidade alegada, foram inúmeros os relatos de resistência a estrobilurinas na última década (KIM et al., 2003). Em situações extremas, por exemplo, para o oídio do trigo, há relato de desenvolvimento de resistência dentro de dois anos de uso comercial (SIEROTZKI; WULLSCHLEGER; GISI, 2000). No caso específico de *P. oryzae* do trigo, nossos resultados indicaram que já em 2005, alguns anos após a introdução de estrobilurinas no mercado brasileiro, 36% da população do patógeno apresentava resistência a azoxistrobina e que, em 2012, sete anos após este percentual saltou para 90% da população do patógeno amostrada.

6 CONCLUSÃO

A resistência aos fungicidas QoI em populações do patógeno *P. oryzae* da brusone do trigo é generalizada em todas as principais áreas de cultivo de trigo no Centro-Sul do Brasil. O haplótipo QoI-R do *cyt b* predomina em todas as principais áreas de trigo no Centro-Sul do Brasil, também sendo detectado em 48% dos isolados derivados de outras plantas poáceas, indicando que outras espécies de plantas poáceas adjacentes a campos de trigo podem ser um importante reservatório do patógeno resistente. Os resultados indicam a necessidade urgente de reavaliar o uso de estrobilurinas para o manejo da brusone e para outras doenças importantes do trigo no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, J. R. N. D. et al. Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos cerrados do Brasil Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 79-82, 1996.
- AVILA-ADAME, C. Transmission of the G143A QoI-resistance point mutation through anastomosis in *Magnaporthe grisea*. **Pest Management Science**, Malden, v. 70, n. 12, p. 1918-1923, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.3758/pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.
- BRENT, K. J. **Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-la?** Bruxelas; GPCF, 1995. p. 51. (FRAC Monografia, 1).
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. Bruxelas; GPCF, 1998. p. 48. (FRAC Monografia, 21).
- CERESINI, P. C. **Estrutura genética de populações do patógeno da brusone do trigo *Magnaporthe oryzae* no Brasil**. 2011. 116 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Ilha Solteira, 2011.
- CHEN, W. J. et al. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 16, p. 5162-5172, 2007.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Malden, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x/pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.
- CRUZ, M. F. 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**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 24-31, 2010.
- CRUZ, M. F. A. et al. Aplicação foliar de produtos na redução da severidade da brusone do trigo. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 424-428, 2011.
- DUVEILLER, E.; HODSON, D.; TIEDMANN, A. Wheat blast caused by *Magnaporthe grisea*: a reality and new challenge for wheat research. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 8., 2010. St. Petersburg. **Conference...** St. Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry, 2010. p. 247- 248.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, Barcelona, v. 11, n. 2, p. 1-9, 2008. Disponível em: <<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/4c457cb1a0401.002/9638>>. Acesso em: 10 abr. 2014.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE – FRAC. **List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides (updated 12/09/12)**. Schwarzwaldallee; Schwarzwaldallee, 2012. Disponível em: <<http://www.frac.info>>. Acesso em: 29 jan. 2013.

GENBANK. **National Center for Biotechnology Information – NCBI**. Rockville Pike; Rockville Pike, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 78.

GISI, U. et al. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, Malden, v. 58, n. 9, p. 859-867, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.565/pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2013.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A. Incidência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 321-325, 1992.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A.; ANDRADE, P. J. M. Relação entre a incidência da brusone em espigas de trigo e a presença de *Pyricularia grisea* nas sementes colhidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 184-189, 1995.

GOULART, A. C. P. et al. Effect of timing and number of applications of fungicides tebuconazole and mancozeb on the control of wheat blast disease (*Pyricularia grisea*) - economical and technical viability. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 381-387, 1996.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A. Perdas no rendimento de grãos de trigo causado por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, n. 2, p. 279-282, 2000.

GOULART, A. C. P. Perdas em trigo causadas pela brusone. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1, 2004, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p. 123-30.

GOULART, A. C. P.; SOUSA, P. G.; URASHIMA, A. S. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 358-363, 2007.

GRASSO, V. et al. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science**, Malden, v. 62, n. 6, p. 465-472, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1236/abstract>>. Acesso em: 15 abr. 2014.

HOBBELEN, P. H.; PAVELEY, N. D.; VAN DER BOSCH, F. The emergence of resistance to fungicides. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-14, 2014. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0091910>>. Acesso em: 15 abr. 2014.

IGARASHI, S. et al. *Pyricularia* em trigo. 1.Ocorrência de *Pyricularia* sp. no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 351-352, 1986.

IGARASHI, S. "Brusone" do trigo – histórico e distribuição geográfica no Paraná. In: REUNIAO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 15, 1988, Passo Fundo. **Resumos...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1988. p. 157.

ISHII, H. et al. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. **Phytopathology**, Palo Alto, v.91, n.12, p.1166-1171, 2001.

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

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

KUNOVA, A.; PIZZATTI, C.; CORTESI, P. Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. **Pest Management Science**, Malden, v. 69, n. 2, p. 278-284, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.3386/full>>. Acesso em: 15 abr. 2014.

LIMA, M. I. P. M.; MINELLA, E. Occurrence of head blast in barley. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 207, 2003.

MA, B.; UDDIN, W.; OLAYA, G. Baseline and non-baseline sensitivity of *Magnaporthe oryzae* isolates from perennial ryegrass to azoxystrobin in the northeastern United States. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Canadá, v. 31, n. 1, p. 57-64, 2009.

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. 1-14 – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 64). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp64.pdf>. Acesso em: 19 set. 2014.

MACIEL, J. L. N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **CABI Reviews - Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Oxfordshire, v. 6, n. 50, p. 1-8, 2011.

MACIEL, J. L. N. et al. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 104, n. 1, p. 95-107, 2014.

MADDEN, L. V.; WHEELIS, M. The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, n. 1, p. 155-176, 2003.

MIKABERIDZE, A.; MCDONALD, B. A.; BONHOEFFER, S. Can high-risk fungicides be used in mixtures without selecting for fungicide resistance? **Phytopathology**, Palo Alto, v. 104, n. 4, p. 324-331, 2014.

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.

OLAYA, G. C. et al. Detection of resistance to QoI in *Rhizoctonia solani* isolates from rice. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 102, n. 7, p. S4.88, 2012. Supplement 4.

OU, S. H. Blast. In: OU, S. H. **Rice diseases**. 2. ed. Wallingford: CAB International, 1985. p. 109-201.

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, 2014. Disponível em: <<http://rd.springer.com/journal/12600/42/5/page/1>>. Acesso em: 8 out. 2014.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de Fungos a Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Maranhão, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.

PEREIRA, J. F. et al. Development of genomic SSR markers and molecular characterization of *Magnaporthe oryzae* isolates from wheat in Brazil. **Biochemical Genetics**, Nova Iorque, v. 52, n. 1-2, p. 52-70, 2014.

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.

REIS, E. M.; LUZ, W. C. Controle químico de doenças do trigo. In: REUNIAO ANUAL CONJUNTA DE PESQUISA DE TRIGO, 8, 1976, Ponta Grossa. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1976. v. 4, p. 106-11.

RODRIGUES, M. B. C. et al. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 323-327, 2007.

SANTANA, F. M. et al. **Eficiência de fungicidas para o controle da brusone do trigo: resultados dos experimentos cooperativos - safra 2011**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2013. p. 20. (Comunicado Técnico, 328). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103711/1/2013-comunicado-tecnico-online328.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2014.

SAS Institute. **System requirements for SAS 9.2 foundation for microsoft windows**. Cary: SAS Institute Inc., 2011. 86 p.

SIEROTZKI, H. et al. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome *b-c1* enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. **Pest Management Science**, Malden, v. 56, n. 10, p. 833-841, 2000.

SIEROTZKI, H.; WULLSCHLEGER, J.; GISI, U. Point mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdã, v. 68, n. 2, p. 107-112, 2000.

SILVA, C. P. et al. Eficiência de tratamentos alternativos no controle de *Pyricularia grisea* em sementes de trigo. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 127-131, 2009.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: A threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 2005. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/toc/phyto/43/1>>. Acesso em: 27 out. 2014.

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 75-100, 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/toc/phyto/46/1>>. Acesso em: 27 out. 2014.

TALBOT, N. J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 177-202, 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.micro.57.030502.090957>>. Acesso em: 29 jan. 2013.

TORRIANI, S. F. F. et al. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, Malden, v. 65, n. 2, p. 155-162, 2008.

URASHIMA, A. S.; IGARASHI, S.; KATO, H. Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1211-1216, 1993.

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, 1998.

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.

VARGAS, M. H. **ED50plus v1.0**. México: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/drug/hcic50.htm>>. Acesso em: 9 mai. 2014.

VINCELLI, P.; DIXON, E. Resistance to QoI (Strobilurin-like) fungicides in isolates of *Pyricularia grisea* from perennial ryegrass. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 3, p. 235-240, 2002. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2002.86.3.235>>. Acesso em: 29 jan. 2013.

WALKER, A. S. et al. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from french naturally infected wheat grains. **Pest Management Science**, Malden, v. 65, n. 8, p. 906-915, 2009.