



**ADRIANO FRANCIS DORIGAN**

**ADAPTABILIDADE COMPETITIVA DE *Pyricularia graminis-tritici* RESISTENTE AOS FUNGICIDAS QoI E SDHI**

**LAVRAS – MG  
2019**

**ADRIANO FRANCIS DORIGAN**

**ADAPTABILIDADE COMPETITIVA DE *Pyricularia graminis-tritici* RESISTENTE  
AOS FUNGICIDAS QoI E SDHI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Eduardo Alves  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo próprio autor.

Dorigan, Adriano Francis

Adaptabilidade competitiva de *Pyricularia graminis-tritici* resistente aos fungicidas QoI e SDHI / Adriano Francis Dorigan. - 2019.

52 p. : il.

Orientador: Eduardo Alves.

Coorientador: Silvino Intra Moreira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Brusone. 2. Trigo. 3. Custo adaptativo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**ADRIANO FRANCIS DORIGAN**

**ADAPTABILIDADE COMPETITIVA DE *Pyricularia graminis-tritici* RESISTENTE  
AOS FUNGICIDAS QoI E SDHI**

**FITNESS AND COMPETITIVE ABILITY OF *Pyricularia graminis-tritici*  
RESISTANT TO QoI AND SDHI FUNGICIDES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2019.

Dr. Edson Ampélio Pozza  
Dr. Paulo Cezar Ceresini

UFLA  
UNESP

Prof. Dr. Eduardo Alves  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2019**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me dar forças nos momentos mais difíceis da minha vida, iluminar-me em minhas escolhas e ser o suporte para traçar minha caminhada até aqui.

Agradeço também aos meus pais Francisco e Maria e ao meu irmão Guilherme, por todo o carinho e amor, além dos conselhos e suporte durante o mestrado.

Aos meus avós Purcina e Sebastião (*in memoriam*), pessoas especiais que se foram, mas que sempre estão conosco de alguma forma.

Aos meus amigos da turma de mestrado em Fitopatologia, durante estes 2 anos de curso, em especial a Amanda, Talita, Victor, Eliseu e a Taty.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Alves pelas orientações ao longo dos 2 anos de mestrado. Ao meu co-orientador Dr. Silvino Intra Moreira por todo auxílio nas execuções dos trabalhos científicos, em especial a este trabalho, também pelos conselhos, experiências e amizade, assim como ao professor Dr. Paulo Cezar Ceresini da UNESP-IIha Solteira por todo suporte nos trabalhos científicos, parcerias, conselhos e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (PPGF), ao Departamento de Fitopatologia (DFP) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela concessão de bolsa e oportunidade de realização do mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), Ginaini Moura, Fabiano França, Thiago Oliveira, Aline Viera, Gilmara Soares, Dérica Gonçalves e Tamara por todo o companheirismo, apoio e momentos de descontração.

As técnicas do LME Elisa Castro e Aline Norberto por toda paciência e suporte fornecido.

Finalmente, a todas as outras pessoas que, por ventura, fizeram parte da minha vida e contribuíram para este trabalho de alguma maneira, direta ou indiretamente. **MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

Fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI) e inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) não têm sido eficazes no manejo da brusone do trigo, causado por *Pyricularia graminis-tritici*, no Brasil. Os primeiros relatos de resistência de *P. graminis-tritici* à QoI e SDHI no Brasil foram em 2015 e 2017, respectivamente. A resistência de *P. graminis-tritici* à QoI está ligada à mutação pontual G143A no gene do citocromo *b* (*cytb*), e a resistência à SDHI, associada a mutações em sítios dos genes *sdhB*, *sdhC* e ou *sdhD*. Não se conhece o efeito de mutações em *cytb* e *sdh* na adaptabilidade de *P. graminis-tritici*. Foram avaliados os componentes de adaptabilidade e habilidade competitiva entre isolados *P. graminis-tritici* sensíveis (S) e resistentes (R) à QoI e SDHI. Foram analisados crescimento micelial, produção de conídios *in vitro* e *in vivo*, período de incubação e agressividade como parâmetros de adaptabilidade. As habilidades competitivas de isolados R e S à QoI e SDHIs foram avaliadas em folhas e espigas de trigo, misturas R:S de 100R:0S, 80R:20S, 50R:50S, 20R:80S, 0R:100S e 0:0. Teor fotossintético e de clorofila *a*, *b* e total foram determinados para folhas de trigo 0, 3 e 7 dias após a inoculação (dpi) dos isolados S e R à QoI e SDHI. Detectou-se diferenças significativas entre os parâmetros de adaptabilidade dos isolados S e R à QoI e SDHI ( $p < 0,05$ ), no qual o isolado R à QoI e SDHI apresentou maior desempenho *in vitro* e *in vivo*, quando comparado ao isolado S. Houve maior produção de conídios *in vivo* em folhas inoculadas com 80R:20S, e maior agressividade em folhas para 100R:0S e 80R:20S, e em espiga, 100R:0S. A maior porcentagem de germinação conidial nas folhas ocorreu para as misturas 100R:0S e 80R:20S quando em QoI, e para SDHI, 80R:20S e 50R:50S. Folhas sintomáticas 7 dpi dos isolados R à QoI e SDHI apresentaram menores teores de fotossíntese e clorofila *a*, *b* e total comparado ao S. A principal contribuição deste estudo foi evidenciar que o isolado resistente a QoI e SDHI apresentou uma vantagem adaptativa comparado com isolado sensível sob as condições testadas.

**Palavras-chaves:** Brusone. Trigo. Custo adaptativo. Azoxistrobina. Fluxapiroxade.

## ABSTRACT

Quinone-outside Inhibitor (QoI) and Succinate Dehydrogenase Inhibitors (SDHI) fungicides haven't been effective for management of wheat blast disease, caused by *Pyricularia graminis-tritici*, in Brazil. The selection for resistance of *P. graminis-tritici* to QoI and SDHI in Brazil were first reported in 2015 and 2017, respectively. The resistance of *P. graminis-tritici* to QoI is associated with the G143A point mutation in the cytochrome *b* (*cytb*) gene, and resistance to SDHI, associated with mutations at sites of the *sdhB*, *sdhC* and or *sdhD* genes. The effect of mutations in *cytb* and *sdh* on the fitness of *P. graminis-tritici* is unknown. Fitness and competitive ability between *P. graminis-tritici* sensitive (S) and resistant (R) to QoI and SDHI were evaluated. Mycelial growth, conidial production *in vitro* and *in vivo*, incubation period and aggressiveness were analyzed as fitness parameters. Competitive ability of isolates R and S was measured by severity in wheat leaf and head inoculated in the R:S mixtures: 100R:0S, 80R:20S, 50R:50S, 20R:80S, 0R:100S and 0:0. Photosynthetic activity and chlorophyll *a*, *b* and total were determined in leaves 0, 3 and 7 d after S and R inoculation (dpi). Significant difference was detected between fitness parameters of S and R strains ( $p < 0.05$ ), in which the isolate R showed higher performance *in vitro* and *in vivo*, when compared with isolate S. *In vivo* conidia production were higher in leaves inoculated with 80R:20S, with greater aggressiveness in leaves inoculated with 100R:0S and 80R:20S, and when in head, 100R:0S. Highest conidial germination percentage in leaves were in 100R:0S and 80R:20S when in QoI, and to SDHI, 80R:20S and 50R:50S. Symptomatic leaves 7 dpi of isolate R showed lower photosynthetic activity and chlorophyll *a*, *b* and total compared to S. The major outcome of this study was evidence the isolate resistant to QoI and SDHI account for a fitness advantage compared with the sensitive isolate one under tested conditions.

**Key words:** Blast. Wheat. Fitness costs. Azoxystrobin. Fluxapyroxad

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sintomas de brusone em folhas e espigas de trigo após inoculação de isolados de <i>P. graminis-tritici</i> .....	27
Figura 2 - Sintomas de brusone em folhas e espigas de trigo após inoculação das misturas de isolados <i>P. graminis-tritici</i> R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI...29	29
Figura 3 - Boxplot da distribuição da virulência de <i>P. graminis-tritici</i> em folhas e espigas de trigo após a inoculação das misturas de isolados <i>P. graminis-tritici</i> R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI, 7 dias após a inoculação (dpi). ....	30
Figura 4 - Número total de conídios de <i>P. graminis-tritici</i> colhidos de folhas de trigo sintomáticas 21 dias após a inoculação (dpi) das misturas R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI. ....	31
Figura 5 - Teste de sensibilidade dos isolados de <i>P. graminis-tritici</i> submetidos a QoI e SDHI, esporulação in vivo, conídios coletados por saco homogeneizador e teste de germinação dos conídios de <i>P. graminis-tritici</i> em 10 µg mL <sup>-1</sup> de QoI e 20 µg mL <sup>-1</sup> de SDHI. ....	33
Figura 6 - Comparação entre a porcentagem de conídios sensíveis (S) e resistentes (R) de <i>P. graminis-tritici</i> antes e após a infecção das misturas R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R inoculadas em folhas de trigo; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI. ....	34
Tabela 1 - Descrição dos isolados de <i>Pyricularia graminis-tritici</i> de áreas de trigo selecionados para o estudo de adaptabilidade competitiva à QoI e SDHI. ....	19
Tabela 2 - Componentes de adaptabilidade dos isolados de <i>P. graminis-tritici</i> sensíveis e resistentes à QoI e SDHI. ....	30



Tabela 3 - Porcentagem de germinação dos conídios sensíveis e resistentes a QoI e SDHI colhidas das folhas de trigo com lesões de brusone esporuladas 21 dias após a inoculação (dpi) dos isolados Py6038, 12.1.127, 12.1.130, 12.1.146 e das misturas R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI. ....33

Tabela 4 - Atividade fotossintética e o teor de clorofilas a, b e total das plantas de trigo inoculadas com isolados de *P. graminis-tritici* e misturas de isolados sensíveis e resistentes à QoI e SDHI.....37

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
2.1 <i>Pyricularia graminis-tritici</i> , o agente causal da Brusone em trigo .....	11
2.2 Resistência de <i>P. graminis-tritici</i> à QoI e SDHI .....	12
2.3 Adaptabilidade competitiva de <i>P. graminis-tritici</i> à QoI e SDHI .....	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 Plantas de trigo e isolados de <i>P. graminis-tritici</i> .....	18
3.2 Componentes de adaptabilidade .....	19
3.3 Habilidade competitiva dos isolados de <i>P. graminis-tritici</i> sensíveis e resistentes à QoI e SDHI .....	21
3.4 Determinação da porcentagem de germinação <i>in vitro</i> e dos conídios colhidos após a infecção dos isolados <i>P. graminis-tritici</i> sensíveis e resistentes à QoI e SDHI em folhas de trigo .....	22
3.5 Determinação da fotossíntese e teor de clorofilas .....	23
3.6 Análise dos dados .....	24
<b>4 RESULTADOS</b> .....	25
4.1 Componentes de adaptabilidade .....	25
4.2 Habilidade competitiva dos isolados de <i>P. graminis-tritici</i> sensíveis e resistentes na ausência de fungicida .....	28
4.3 Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> .....	31
4.4 Porcentagem de conídios de <i>P. graminis-tritici</i> sensíveis e resistentes colhidos das folhas sintomáticas de trigo .....	34
4.5 Determinação da atividade fotossintética e o teor de clorofilas .....	35
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

A brusone do trigo causada pelo fungo ascomiceto *Pyricularia graminis-tritici* (CASTROAGUDIN et al., 2016), um dos principais fitopatógenos do trigo (*Triticum aestivum*). Além do trigo, *Pyricularia* spp. causam brusone em cerca de 50 espécies da família Poaceae (OU, 1985) incluindo culturas de importância econômica entre elas o arroz, cevada, milho e aveia (URASHIMA e KATO, 1998; COUCH e KOHN, 2002; TAKABAYASHI et al., 2002; MURAKAMI et al., 2003; COUCH et al., 2005). Pela inexistência de resistência varietal em cultivares de trigo à brusone, pulverizações de fungicidas dirigida às espigas tornou-se a principal alternativa para manejo integrado de brusone em trigo (GOULART et al., 2007). Entretanto, a eficiência das pulverizações com fungicidas no controle da brusone foi substancialmente baixa (PAGANI et al., 2014).

A resistência de *P. graminis-tritici* à fungicidas Inibidores da quinona oxidase (QoI) é conferida pela mutação no gene do citocromo *b* (*cytb*) por meio da substituição do aminoácido glicina por alanina no códon 143 (G143A) (CASTROAGUDIN et al., 2015). Outra mutação pode ocorrer no gene *cytb*, de fenilalanina para leucina na posição 129 (F129L) ligada a resistência de fungos a QoI (GISI et al., 2002; GRASSO et al., 2006), incluindo *Phakopsora pachyrhizi* na soja (KLOSOWSKI et al., 2016; MAY DE MIO et al., 2018). Além disso, a resistência de fungos a QoI pode estar associada a redução da absorção ou aumento do efluxo do fungicida, a falta de conversão para o composto ativo e detoxificação da molécula fungicida (HAWKINS e FRAAIJE, 2018). Por outro lado, a resistência dos fitopatógenos à SDHs (inibidores da succinato desidrogenase) origina-se por meio de mutações em sítios únicos (*SNP* - *single nucleotide polymorphism*) de genes do complexo SDH, por substituições de aminoácidos nos genes *sdhB*, *sdhC* ou *sdhD* (AVENOT e MICHAILIDES, 2009). Em adição, a resistência de fungos a SDHI também pode estar relacionada a alterações na atividade da bomba de efluxo do fungicida (HAWKINS e FRAAIJE, 2018).

Uma distribuição generalizada da resistência de populações de *P. graminis-tritici* para azoxistrobina e piraclostrobina (CASTROAGUDIN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015) e para tebuconazol e epoxiconazol (POLONI, 2016) foi constatada no centro-sul do Brasil. Os valores de concentração dos fungicidas que induz metade do

efeito máximo (EC<sub>50</sub>) foram de pelo menos 30 a 200 vezes superiores aos isolados sensíveis (CERESINI, et al., 2018a). Por último, Casado (2017) evidenciou a resistência dessas mesmas populações ao fungicida SDHI fluxapiraxade. Ou seja, a emergência de resistência tripla em populações de *P. graminis-tritici* a diferentes classes de fungicidas de alto risco.

Algumas mutações que conferem resistência a fungicidas podem diminuir a eficiência de importantes processos fisiológicos e bioquímicos do fungo (ANDERSON, 2005). Assim, efeitos pleiotrópicos deletérios podem surgir, ou seja, mais de um fenótipo associado a um único gene, conhecido como custo adaptativo (*fitness cost*) (SCHOUSTRA et al., 2005; JEGER et al., 2008). Uma mutação ligada a resistência pode por consequência diminuir a adaptabilidade (*fitness*) dos fitopatógenos (ISHII e HOLLONON, 2015). A adaptabilidade pode ser definida como a sobrevivência e sucesso reprodutivo de um alelo, indivíduo ou grupo, ou, em outras palavras, a contribuição da progênie para as próximas gerações (WORRALL, 1999).

Vários componentes da adaptabilidade podem ser mensurados para fitopatógenos que carregam as mutações G143A e F129L no gene (*cytb*) (MA e MICHAILIDES, 2005) e nos genes do complexo *sdh* (SIEROTZKI e SCALLIET, 2013). Nesse contexto, a adaptabilidade de uma mutação que confere resistência a um fungicida pode ser determinada pela diferença de adaptabilidade entre isolado do patógeno resistente que carrega a mutação e um isolado de patógeno sensível na ausência de fungicida, em um mesmo ambiente, não seletivo (ISHII e HOLLONON, 2015).

Forcelini et al. (2018) observou que, na ausência do fungicida QoI, crescimento micelial, agressividade e produção de conídios em isolados de *Colletotrichum accutatum* que carregavam a mutação G143A foram similares aos valores obtidos pelos isolados sensíveis. Resultados semelhantes foram verificados em isolados de *B. cinerea* (VELOUKAS et al., 2014) e mutantes de *Pyricularia grisea* gerados em laboratório (AVILA-ADAME e KOLLER, 2003). Por outro lado, isolados de *B. cinerea* que carregavam mutações no gene *sdh* mostraram uma redução de adaptabilidade quando comparado aos isolados sensíveis (VELOUKAS et al., 2014). Então, o custo adaptativo reduz a virulência do isolado resistente.

Desde o primeiro relato de resistência de *P. graminis-tritici* à fungicidas QoI em 2015 e SDHI em 2017 (CASTROAGUDIN et al., 2015; CASADO, 2017), não se tem conhecimento sobre o efeito da resistência à QoI e SDHI na adaptabilidade de *P. graminis-tritici* em trigo. Investigar a adaptabilidade competitiva entre isolados resistentes e sensíveis pode confirmar se a resistência está ou não estabelecida na população (PARNELL et al., 2005), além de identificar mudanças na frequência de isolados resistentes ao longo do tempo (SUZUKI et al., 2010).

Dessa forma, nosso trabalho objetivou: (i) mensurar os componentes de adaptabilidade dos isolados *P. graminis-tritici* resistentes a QoI e SDHI, tais como crescimento micelial, produção de conídios *in vitro* e *in vivo*, período de incubação e virulência dos isolados em plantas e espigas de trigo (ii) determinar a adaptabilidade competitiva de isolados resistentes e sensíveis à QoI e SDHI na ausência de fungicida (iii) investigar a relação entre a virulência dos isolados *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes a QoI e SDHI e a atividade fotossintética e teor de clorofila *a*, *b* e total em plantas de trigo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Pyricularia graminis-tritici*, o agente causal da Brusone em trigo

*Pyricularia graminis-tritici* (CASTROAGUDIN et al., 2016) é um fungo ascomiceto da família *Pyriculariaceae* (KLAUBAUF et al., 2014) agente causal da brusone em trigo (*T. aestivum*). Esta doença é considerada um dos maiores obstáculos para a expansão da produção de trigo no Brasil (MACIEL et al., 2014). O fungo é capaz de infectar folhas e espigas de trigo (CASTROAGUDIN et al., 2016). As perdas em produtividade nos campos de trigo podem chegar a 72,5% do peso das espigas quando as condições são ótimas para o processo de infecção e colonização do fungo (GOULART e PAIVA, 2000).

Desde o primeiro relato de brusone do trigo em municípios ao norte do Paraná, Brasil, no ano de 1985 (IGARASHI, 1986) observou-se uma disseminação generalizada do patógeno em todas as principais áreas produtoras de trigo no Brasil, inclusive em alguns países vizinhos (MACIEL et al., 2014). Também foram relatadas a ocorrência de brusone em trigo na Bolívia, Argentina e Paraguai (DUVEILLER et al., 2010). Nos últimos anos a brusone do trigo tornou-se uma restrição biótica para a produção de trigo em campos de cultivo na região do cone sul da América do sul, causando perdas na produção de 10 a 100% (DUVEILLER, 2016). Até a última década não haviam relatos sobre a incidência de brusone do trigo fora do continente sul-americano (MACIEL, 2011). Em fevereiro de 2016 relatou-se pela primeira vez brusone do trigo na Ásia em campos de oito distritos de Bangladesh, as perdas na produção atingiram até 100% (ISLAM et al., 2016). Sementes de trigo com inóculo do fungo provavelmente facilitou a dispersão de *P. graminis-tritici* a longas distâncias permitindo assim a entrada do patógeno nos agroecossistemas Sul americanos e recentemente no sudeste asiático (GOMES et al., 2017).

A patógeno da brusone do trigo é geralmente disseminado via sementes infectadas e esporos no ar, além disso, o fungo possui capacidade de sobrevivência em

restos de culturas com inóculo e sementes (URASHIMA et al., 1999). Os sintomas típicos da brusone em trigo podem ser observados nas folhas por pequenas lesões elípticas com margem marrom escura e centro claro acinzentado. As lesões com esporulação ocorrem na coloração cinza pela cor dos esporos colonizando o tecido (VALENT et al., 2013). O sintoma mais característico da brusone ocorre nas espigas de trigo com branqueamento precoce da porção acima do ponto de infecção do patógeno, na ráquis da espiga. Espigas de trigo infectadas de forma severa por *P. graminis-tritici* podem morrer, ocasionando perdas relevantes na produção (MALAKER et al., 2016; CERESINI et al., 2018b).

Alguns cultivares de trigo do Brasil foram testados quanto à resistência varietal à brusone e apresentaram resistência a doença no estágio de plantas para um subgrupo de isolados de trigo, porém nenhuma resistência foi encontrada para todos os isolados testados (URASHIMA et al., 2004; CRUZ et al., 2012). As variedades que exibem a resistência ao estágio das mudas são muitas vezes menos suscetíveis no estágio de espiga. Ainda não foram identificadas variedades de trigo com resistência de alto nível e amplo espectro a todos os grupos de virulência de *P. graminis-tritici* (VALENT et al., 2013). A inexistência de resistência varietal somada a ausência de fungicidas eficazes no controle da brusone dificultam o manejo desse patógeno nos campos de trigo (MACIEL et al., 2014; CASTROAGUDIN et al., 2015).

## **2.2 Resistência de *P. graminis-tritici* à QoI e SDHI**

O número total de fungicidas recomendados para controlar a brusone em campos de trigo, com registro no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) é de 43, incluindo 17 triazóis e sete misturas de QoIs (Inibidores da quinona oxidase) e triazóis (inibidores da desmetilação de ergosterol) (MAPA, 2019). Entre os vários grupos de fungicidas utilizados no manejo de doenças do trigo, os QoIs têm sido amplamente empregados no controle da brusone. Por outro lado, SDHI (inibidores da succinato desidrogenase) são os fungicidas mais modernos registrados para o manejo de doenças do trigo no Brasil, também é usado no controle da brusone (MAPA, 2019).

Entre os princípios ativos dos QoIs mais aplicados no manejo das doenças foliares do trigo de forma isolada ou em mistura com outros grupos químicos são basicamente azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina (MAPA, 2019). As estrobilurinas pertencem a classe dos fungicidas inibidores da respiração mitocondrial e atuam sobre a quinona oxidase (Qo), assim sendo denominados fungicidas QoI (Inibidores da quinona oxidase) (PARREIRA et al., 2009). O mecanismo de ação dos fungicidas QoI ocorre pela inibição da respiração mitocondrial por bloqueio da transferência de elétrons no citocromo *b* (codificada pelo gene *cyt b*), desse modo, interrompendo a respiração mitocondrial e a produção de ATP (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

Devido ao alvo específico de ação, os fungicidas QoI estão propensos a um alto risco de seleção de isolados de patógenos resistentes a alguns princípios ativos. A resistência à estrobilurina para *P. graminis-tritici* e outros patógenos ocorrem pela alteração de um único nucleotídeo que resulta na mudança de um aminoácido no códon 143 de glicina para alanina (G143A) e de fenilalanina para leucina na posição 129 (F129L) nas sequências do gene *cyt b* (GISI et al., 2002; GRASSO et al., 2006).

Recentemente Castroagudin et al. (2015) evidenciou isolados de *P. graminis-tritici* associados a trigo e plantas invasoras de campos de trigo resistentes à azoxistrobina de forma generalizada no centro sul do Brasil. Outros fitopatógenos de diversas culturas, incluindo o trigo (*Blumeria graminis f. sp. tritici*), a cevada (*B. graminis f. sp. hordei*), a banana (*Mycosphaerella fijiensis*), a videira (*Plasmopara viticola*) e a macieira (*Venturia inaequalis*) foram relatados como resistentes aos fungicidas QoI (GISI et al., 2002; FRAC, 2014; VILLANI e COX, 2014).

O mecanismo mais comum de resistência é a alteração do sítio alvo dos fungicidas, ocasionada por mutações no gene que codifica a proteína alvo. Porém outros mecanismos podem estar relacionados a resistência de fungos a QoI como alterações na atividade de bombas de efluxo, a falta de conversão para o composto ativo e detoxificação da molécula (JABS et al., 2001; WOOD e HOLLON, 2003; OMRANE et al., 2015; HAWKINS e FRAAIJE, 2018).

Os fungicidas SDHIs foram amplamente utilizados por agricultores principalmente pela necessidade de uma molécula alternativa para combater a resistência aos fungicidas QoI e DMI (inibidores da desmetilação de ergosterol)



(SIEROTZKI e SCALLIET, 2013). A carboxina pertencente a primeira geração dos fungicidas SDHI foi utilizado na agricultura desde a década de 1960 contra fungos basidiomicetos, tais como a ferrugem e *Rhizoctonia*, porém possuía atividade limitada para outros patógenos (ZHANG et al., 2009). Na nova geração dos fungicidas SDHI teve-se o emprego de boscalid (BASF), fluxapiraxade, pentiopirade (Mitsui Chemicals), isopirasame (Syngenta), fluopirame (Syngenta), bixafen (Bayer) e o sedaxane (Syngenta), ambos com amplo espectro de atividade fúngica atuando sobretudo contra doenças de cereais causadas por fungos ascomicetos fitopatogênicos (AVENOT e MICHAILIDES, 2009; SCALLIET et al., 2012).

O mecanismo de ação dos fungicidas SDHI é o complexo succinato desidrogenase (SDH) presente na cadeia respiratória mitocondrial, também denominado como complexo II ou succinato: ubiquinona oxireductase (SQR) (AVENOT e MICHAILIDES, 2009). As moléculas SDHIs ligam-se especificamente ao sítio da ubiquinona (*Q-site*) do complexo II mitocondrial e inibem a respiração do fungo (MIYAMOTOA et al., 2010). A resistência de patógenos aos SDHIs pode se dar por mutações em sítios únicos (*SNP - single nucleotide polymorphism*) em genes do complexo SDH (AVENOT e MICHAILIDES, 2009).

A resistência de fungos a SDHI também pode estar relacionada a alterações na atividade da bomba de efluxo do fungicida. O mecanismo envolvido é a super-expressão de bombas de efluxo do transportador (ABC) cassete de ligação de ATP ou das principais superfamílias facilitadoras. Essas proteínas integrais da membrana catalisam o efluxo do fungicida para fora da célula utilizando a energia da hidrólise do ATP (transportador ABC) ou da força próton-motriz, respectivamente. A super-expressão confere resistência a muitos componentes tóxicos estruturalmente e funcionalmente não relacionados (OMRANE et al., 2015; HAWKINS e FRAAIJE, 2018). Isolados de campo de *Zymoseptoria tritici* possuem mutações MDR que proporcionam super-expressão de genes codificantes para bombas de efluxo, porém todos os mecanismos que conferem MDR ainda não foram elucidados (OMRANE et al., 2015).

Recentemente relatou-se um fato inédito na agricultura brasileira com a resistência tripla em populações de *P. graminis-tritici* no centro-sul do Brasil à diferentes classes de fungicidas sistêmicos de alto risco amplamente empregados nos

campos de trigo. Castroagudin et al. (2015) identificou altos níveis de resistência das populações de *P. graminis-tritici* ao fungicida azoxistrobina pertencente ao grupo dos fungicidas QoI (Inibidores da quinona oxidase). Também foi revelada a ocorrência de resistência cruzada entre azoxistrobina e piraclastrobina (OLIVEIRA et al., 2015). Da mesma forma, POLONI (2016) observou altos níveis de resistência nestas mesmas populações de *P. graminis-tritici* aos fungicida epoxiconazol e tebuconazol da classe dos DMIs (inibidores da desmetilação de ergosterol) e por último à fluxapirroxade, da classe dos SDHI (inibidores da succinato desidrogenase) (CASADO, 2017). Quando 170 isolados de *P. graminis-tritici* amostrados em 2013 de diferentes regiões do centro-sul do Brasil foram avaliados quanto a sensibilidade a fluxapirroxade, verificou-se que a maioria dos isolados foram insensíveis e com resistência moderada nas cinco das seis populações do patógeno testadas (CASADO, 2017; CERESINI et al., 2018b). Esses resultados foram surpreendentes uma vez que essas populações de *P. graminis-tritici* não tinham sido expostas aos SDHIs de segunda geração (CERESINI et al., 2018b).

Altos níveis de resistência em outros fitopatógenos aos SDHIs foram relatados para Boscalid, incluindo *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Corynespora cassiicola*, *Didymella bryoniae*, *Aspergillus oryzae*, *Podosphaera xanthii*, *Stemphylium botryosum*, *Mycosphaerella graminicola* e *Penicillium expansum* (SIEROTZKI e SCALLIET, 2013; MALANDRAKIS et al., 2017).

As mutações associadas a resistência a fungicidas podem exibir efeitos pleiotrópicos deletérios, isto é, mais de um fenótipo associado a um único gene, conhecido como custo adaptativo (*fitness cost*) que se torna aparente na ausência de pressão de seleção do fungicida (SCHOUSTRA et al., 2005; JEGER et al., 2008).

### **2.3 Adaptabilidade competitiva de *P. graminis-tritici* à QoI e SDHI**

A adaptabilidade (*fitness*) dos fungos fitopatogênicos pode ser constituída por vários componentes que correspondem a diferentes estádios do ciclo de vida dos agentes patogênicos. Entre eles, não só limitados à produção e dispersão de esporos, eficiência de infecção, crescimento micelial e a capacidade de sobrevivência entre as estações. A medida final de adaptabilidade consiste na habilidade competitiva com outros isolados

em ambiente caracterizado por condições ambientais flutuantes e interações com uma grande variedade de genótipos hospedeiros e microbiota concorrente (ISHII e HOLLOMON, 2015).

Por definição, adaptabilidade dos fungos fitopatogênicos refere-se a sobrevivência e o sucesso reprodutivo de um alelo, indivíduo ou grupo (PRINGLE e TAYLOR, 2002). Por outro lado, custo adaptativo (*fitness cost*) de uma mutação que confere resistência a um fungicida pode ser definida como a diferença de adaptabilidade entre isolado do patógeno resistente que carrega a mutação e um isolado de patógeno sensível na ausência de fungicida. Dessa forma, para determinar custo adaptativo é preciso medir a adaptabilidade dos isolados de patógenos sensíveis e resistentes no mesmo ambiente, não seletivo (ISHII e HOLLOMON, 2015).

A dinâmica da competição entre isolados resistentes a fungicidas e isolados sensíveis determina se a resistência está ou não estabelecida na população do fitopatógeno (PARNELL et al., 2005). Os estudos de competição entre um isolado resistente e um sensível em sua maioria determina a adaptabilidade na ausência de fungicida (PARNELL et al., 2005). Vale destacar, a evolução da resistência a fungicidas em populações de fungos é amplamente dependente de adaptabilidade de isolados que afeta a dinâmica de competição entre isolados resistentes e sensíveis, e isso tem implicações importantes para o manejo das doenças (PEEVER e MILGROOM, 1995; PARNELL et al., 2005). A ausência ou presença de adaptabilidade associado à resistência a fungicida dependem da espécie do fungo e classe do fungicida (KARAOGLANIDIS et al., 2001; MA e MICHAILIDES, 2004; COX et al., 2007).

Ao estudar a adaptabilidade competitiva à piraclostrobina e isolados de *Botrytis cinerea* resistentes a boscalida em maçãs verificou-se que a resistência à piraclostrobina e boscalid foram estáveis na ausência dos fungicidas e a resistência não prejudicou componentes de adaptabilidade testados. Porém, tanto à piraclostrobina e isolados resistente à boscalida apresentaram desvantagem competitiva em relação ao isolado sensível de maçã (KIM e XIAO, 2011).

Ao inocular o azevém perene (*Lolium perenne* L.) com mistura de isolados de *Magnaporthe oryzae* *Lolium* sensíveis e resistentes à azoxistrobina, observaram que os isolados sensíveis produziram mais conídios e aumentaram em frequência ao longo do tempo na ausência do fungicida, consistente com um custo adaptativo para resistência à

azoxistrobina (MA e UDDIN, 2009). De forma semelhante, a frequência de isolados de *Cercospora beticola* levemente resistentes a fungicidas DMIs diminuiu significativamente durante uma epidemia em competição com isolados DMIs sensíveis (KARAOGLANIDIS et al., 2001).

Em contrapartida, isolados de *Phytophthora erythroseptica* resistentes e sensíveis a mefenoxam mostraram habilidade competitiva quando o fungicida estava ausente, sugerindo não haver custo adaptativo (CHAPARA et al., 2011). Da mesma forma, não foi observado custo adaptativo em *Alternaria alternata* resistente aos fungicidas QoI (KARAOGLANIDIS et al., 2011) e isolados de *Phytophthora nicotianae* resistentes à mefenoxam (HU et al., 2008).

Atualmente, uma estratégia que vem sendo adotada com a finalidade de reduzir o risco de seleção para a resistência, consiste em misturar um fungicida de alto risco de emergência da resistência (alvo único de ação) com um fungicida de baixo risco (vários alvos de ação). Assim, torna-se mais difícil a seleção para a resistência no caso dos fungicidas de baixo risco e contribui para a manutenção da eficácia do componente de alto risco da mistura (LUCAS et al., 2015). Hobbelen et al. (2011) notaram que a resistência a fungicidas de alto risco não implica em custo adaptativo para o patógeno, e ainda afirmaram que a manutenção da dose completa de fungicidas de baixo risco e variação dos de alto risco retardou a seleção e aumentou a vida útil dos fungicidas de alto risco.

Se o custo adaptativo de resistência estiver ausente, o uso de fungicida de alto risco em uma mistura seleciona para resistência, ocasionalmente tornando não funcional. Porém, se houver um custo adaptativo de resistência, pode encontrar-se uma proporção ótima de fungicidas na mistura na qual a seleção de resistência deve desaparecer e o nível de controle poderá ser otimizado (ISHII e HOLLomon, 2015).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Plantas de trigo e isolados de *P. graminis-tritici*

Plantas de trigo (*Triticum aestivum*) cv Anahuac 75 foram cultivadas a partir da sementeira de três sementes em potes plásticos de 770 mL contendo substrato para plantas Tropstrato HT hortaliças (Vida Verde, Campinas, SP). Diariamente as plantas foram irrigadas e a cada 15 dias aplicou-se 0,84 gramas/potes do formulado (10-10-10) N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O. As plantas de trigo foram mantidas em casa de vegetação até atingirem o estágio de crescimento 14 de plântula e 60 com a emissão das espigas (ZADOCKS et al., 1974). A sementeira das plantas destinadas a inoculação em espigas foi realizada 30 dias antes das plantas designadas para inoculação em folhas. Assim, foi possível conduzir as inoculações do fitopatógeno em plantas com estágio de crescimento 14 e 60, no mesmo momento.

Quatro isolados de *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes à QoI e SDHI (CASTROAGUDIN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; CASADO, 2017) foram selecionados para estudar a adaptabilidade competitiva. Os isolados foram obtidos dos campos de trigo nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. A amostragem dos isolados foi realizada em folhas e espigas de trigo com sintomas típicos de brusone usando-se o sistema transecto nos estados de Goiás (GO) e Mato Grosso do Sul (MS), durante os anos de 2006 e 2012, respectivamente (Tabela 1).

Os isolados com resistência aos fungicidas QoI possuem a mutação G143A nas sequências do gene *cyt b*. No entanto, os isolados resistentes à SDHI não possuem mutações em quaisquer um dos três genes que codificam os componentes alvos do complexo SDH (SDH B, C e D), sendo possível estarem relacionados a mecanismos de bombas de efluxo (HAWKINS e FRAAIJE, 2018).

Os quatro isolados de *P. graminis-tritici* analisados nesse estudo estão conservados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual

Paulista “Júlio de Mesquita Filho” do campus de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, sob responsabilidade do professor Paulo Cezar Ceresini.

Tabela 1 - Descrição dos isolados de *Pyricularia graminis-tritici* de áreas de trigo selecionados para o estudo de adaptabilidade competitiva à QoI e SDHI.

Isolado	Hospedeiro	Origem, ano	Sensibilidade aos fungicidas <sup>a</sup>		Referência
Py 6038	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	Goiânia, GO, 2006	QoI-S	SDHI-S	Castroagudin, 2015; Casado 2017
12.1.127	Trigo ( <i>T. aestivum</i> )	Amambai, MS, 2012	QoI-R	SDHI-S	Castroagudin, 2015; Oliveira 2015; Casado 2017
12.1.130	Trigo ( <i>T. aestivum</i> )	Amambai, MS, 2012	QoI-S	SDHI-R	Castroagudin, 2015; Oliveira 2015; Casado 2017
12.1.146	Trigo ( <i>T. aestivum</i> )	Amambai, MS, 2012	QoI-R	SDHI-R	Castroagudin, 2015; Oliveira 2015; Casado 2017

Legenda: <sup>a</sup> S = Sensível, e R = Resistente.

Fonte: Do autor (2019)

### 3.2 Componentes de adaptabilidade

Os componentes de adaptabilidade foram determinados para isolados de *P. graminis-tritici* resistentes e sensíveis à QoI e SDHIs: (i) crescimento micelial em BDA, (ii) produção de esporos *in vitro*, (iii) período de incubação, (iv) virulência e (v) produção de esporos *in vivo*. Todos experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizados, com quatro repetições de cada tratamento, o experimento foi repetido uma vez.

*Crescimento micelial.* Discos de micélio (7mm de diâmetro) dos quatro isolados foram repicados de culturas com sete dias de crescimento em BDA mantidas sob condições de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Cada placa de BDA recebeu um disco micelial que foi colocado em contato direto com a superfície do meio de cultura. As placas foram seladas e incubadas e mantidas a temperatura contínua de 25°C e fotoperíodo de 12 h por sete dias. Duas medidas diametral foram realizadas para mensurar o crescimento micelial de cada colônia com um paquímetro de 100 mm.

*Produção de esporos in vitro.* Para determinar a produção de esporos para cada isolado, 15 placas incrementadas com meio BDA e aveia foram inoculadas com discos de micélio (7mm de diâmetro) e incubadas e mantidas por 15 dias a 25°C com luz constante. Para facilitar a liberação de conídios acrescentou-se 3-5 mL de água destilada implementada com espalhante adesivo Tween 80 (10 µL. L<sup>-1</sup>) ao meio de cultura. Com uma espátula esterilizada realizou-se a raspagem do micélio para obtenção dos conídios. A concentração da suspensão de esporos foi mensurada utilizando-se uma câmara de Neubauer. Cada repetição por tratamento foi obtida a partir da suspensão de esporos de cinco placas por isolado.

*Período de incubação e virulência.* Após o preparo das plantas de trigo e inóculo dos isolados de *P. graminis-tritici* conforme os procedimentos descritos nos itens 3.1 e 3.2, respectivamente; determinou-se o período de incubação da doença e a agressividade dos isolados de *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes a QoI e SDHI. Os isolados foram inoculados em folhas das plantas de trigo 30 dias após a emergência, no estágio de crescimento 14 (ZADOCKS et al., 1974). Também realizou-se a inoculação após a emissão das espigas de trigo no início da fase de antese, estágio de crescimento 60 (ZADOCKS et al., 1974). Os isolados esporularam após 15 dias de crescimento das colônias em BDA e a suspensão conidial foi obtida realizando-se a raspagem do micélio com adição de 3-5 gotas de água destilada implementada com espalhante adesivo Tween 80 (10 µl. L<sup>-1</sup>). A concentração da suspensão de inóculo foi ajustada para (10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup>). Com auxílio de uma bomba de spray de ar sob pressão realizou-se a inoculação dos isolados de *P. graminis-tritici* até o total molhamento da planta. O volume da suspensão de conídios para inocular cada isolado tanto em folhas quanto em espigas de trigo foi de 25 mL.

Após inocular as plantas foram submetidas a câmara de crescimento com nebulização por 24 horas sob temperatura de 25°C, umidade relativa ajustada para 90% e sem fotoperíodo. Em seguida as plantas foram mantidas em câmara de crescimento por 7 dias nas mesmas condições e fotoperíodo de 12 horas. O controle do experimento foi composto por inoculação em folhas e espigas de trigo utilizando água destilada implementada com espalhante adesivo Tween 80.

Durante esses 7 dias, as folhas e espigas de trigo inoculadas foram examinadas a fim de determinar o período de tempo entre a inoculação e o surgimento das primeiras lesões (período de incubação), em cada folha e espiga inoculada.

A agressividade de *P. graminis-tritici* em folhas e espigas de trigo foi avaliada 7 dias após a inoculação, fotografando-se com câmera digital as folhas e as duas faces das espigas com sintomas. Para determinar a severidade da brusone em folhas e espigas de trigo utilizou-se o software para análise de fotografias digitais *Assess Image Analysis Software for Plant Disease Quantification version 2.0* da APS - American Phytopathological Society (Lamari, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá).

*Produção de esporos in vivo.* Vinte e um dias após inocular os isolados de *P. graminis-tritici* em plantas de trigo determinou-se a produção de esporos do fungo *in vivo* a partir de folhas infectadas e com lesões típicas de brusone. Três folhas de trigo esporuladas de cada tratamento foram colocadas separadamente em sacos homogeneizador com filtro LABPLAS® com tamanho dos poros de aproximadamente 330 microns para a coleta dos conídios de *P. graminis-tritici*. Adicionou-se 10 mL de água esterilizada em cada saco filtro e posteriormente conduziu para o homogeneizador stomacher por 5 min com velocidade média ajustada de 490 batimentos por minuto a fim de desalojar os conídios das lesões. O número de conídios foi quantificado em câmara de Neubauer.

### **3.3 Habilidade competitiva dos isolados de *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes à QoI e SDHI**

Os experimentos de habilidade competitiva em folhas e espigas de trigo foram realizados em delineamento inteiramente casualizados com quatro repetições de cada tratamento, e o experimento foi repetido uma vez.

Misturas R:S utilizando como inóculo inicial os isolados 12.1.146 resistente (R) à QoI e SDHI e o isolado Py6038 sensível (S) foram realizadas nas proporções de 100R:0S, 80R:20S, 50R:50S, 20R:80S, 0R:100S e 0:0. As misturas dos isolados foram preparadas com volumes adequados da suspensão de conídios tanto do isolado R quanto



o isolado S na concentração de  $10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  para produzir as respectivas proporções das combinações.

Cada mistura foi inoculada em folhas e espigas de trigo. A inoculação, coleta dos conídios das lesões de brusone em folhas além dos testes de porcentagem de germinação de conídios na presença de QoI e SDHI e a determinação da porcentagem de conídios colhidos resistentes e sensíveis para QoI e SDHI foram realizados conforme os procedimentos descritos nos itens 3.2 e 3.4.

### **3.4 Determinação da porcentagem de germinação *in vitro* e dos conídios colhidos após a infecção dos isolados *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes à QoI e SDHI em folhas de trigo**

O teste de germinação dos isolados de *P. graminis-tritici* foi determinado para o fungicida QoI (Azoxistrobina  $250 \text{ g L}^{-1}$ , Syngenta, Basel, Suíça) e SDHI (Fluxaproxade, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). A solução estoque para fungicida azoxistrobina foi obtida após dissolução em água deionizada na concentração de ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e em acetona para fluxaproxade ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

A porcentagem de germinação dos isolados resistentes foi determinada adicionando-se  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QoI e SDHI, respectivamente em meio líquido BD (Batata-dextrose, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) com  $24 \text{ g/L}^{-1}$  e suplementado com cloranfenicol + sulfato de estreptomicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A porcentagem de germinação foi determinada contando 20 conídios de cada repetição escolhidos de forma aleatória. Para cada tratamento realizou-se quatro repetições e esse experimento foi repetido uma vez e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O controle do experimento foi realizado sem a adição de conídios em meio líquido BD. Realizou-se a contagem e determinação do número total de conídios germinados em meio BD sem os fungicidas QoI e SDHI. Para inibir a via alternativa da oxidase adicionou-se  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido salicil-hidroxiâmico (SHAM) em meio BD incrementado com QoI e SDHI e sem fungicida.

Uma suspensão conidial de  $100 \mu\text{L}$  de cada isolado sensível e resistente foi adicionada em  $100 \mu\text{L}$  de meio BD na proporção de (1:1) e incrementado com QoI, SDHI e sem fungicida em uma placa de 24 poços estéril. Após as placas serem incubadas a  $25^\circ\text{C}$  por 16 horas no escuro, os conídios foram analisados no microscópio

de luz. Os conídios foram considerados germinados quando o tubo germinativo de aparência normal atingisse ao menos o comprimento de um conídio (OLAYA et al., 1998).

Da mesma forma que se determinou a porcentagem de germinação conidial *in vitro* também determinou-se a porcentagem de conídios colhidos após a infecção nas folhas de trigo. A porcentagem de conídios resistentes foi determinada por meio do cálculo:  $[(A/B)/(C/D)] \times 100$ ; porcentagem de conídios sensíveis =  $100 -$  (porcentagem de conídios resistentes). Onde A = o número de conídios germinados em meio incrementado com QoI ou SDHI, B = número total de conídios contados em meio incrementado com QoI ou SDHI, C = o número de conídios germinados em meio sem fungicida e D = o número total de conídios contados em meio sem fungicida. (A/B) calcula a taxa de germinação dos conídios resistentes de todos conídios coletados pelo fato do meio incrementado com QoI ou SDHI permitir somente a germinação de conídios de isolados resistentes. (C/D) calcula a taxa de germinação de todos conídios coletado pelo fato dos mesmos germinarem igualmente bem em meio sem fungicida. Desta maneira,  $[(A/B)/(C/D)] \times 100$  representa a porcentagem de conídios resistentes (não a porcentagem de conídios resistentes germinados) nos conídios coletados.

### 3.5 Determinação da fotossíntese e teor de clorofilas

Plantas de trigo no estágio de crescimento 14 foram inoculadas com isolados de *P. graminis-tritici* e as misturas descritas no item 3.4 na concentração de  $10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . A primeira avaliação foi realizada antes da inoculação e as posteriores com 3 e 7 dias após a inoculação (dpi). Uma folha de trigo de cada tratamento foi utilizada para as análises da taxa de fotossíntese e teores de clorofilas. A avaliação da fotossíntese foi realizada utilizando-se o analisador de gás infravermelho (IRGA, modelo LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA). As leituras foram realizadas com fonte de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), em câmara fechada, fixada em  $750 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Blue + Red LED L1-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA).

O teor de clorofila foi mensurado indiretamente por meio de leituras realizadas com o medidor portátil de clorofila SPAD-502<sup>®</sup> (*SoilPlantAnalysisDevelopment*).

Clorofilas 'a', 'b' e total (soma 'a + b') foram determinadas. A clorofila 'a' foi determinada por meio da equação:  $0,0008 * (\text{valor SPAD}) - 0,0053$  e a clorofila 'b' pela equação:  $0,0004 * (\text{valor SPAD}) - 0,0032$ ; conforme os teores de clorofila mensurados em folhas de café (*Coffea arabica*) (Perez, 2016).

### 3.6 Análise dos dados

Os dados obtidos dos dois experimentos para cada componente de adaptabilidade, germinação conidial *in vitro*, habilidade competitiva de *P. graminis-tritici* em folha e espigas de trigo além e taxa de fotossíntese e teor de clorofilas testado foram agrupados após o teste de homogeneidade da variância usando o teste de Levene e submetido ao teste de normalidade e independência. Após os pressupostos da Anova serem atendidos conduziu-se a análise de variância (ANOVA). Procedeu-se a análise conjunta dos dados entre as duas réplicas de cada experimento testado. A análise conjunta foi realizada se o quociente entre o maior e o menor quadrado médio residual entre as réplicas do experimento fosse menor que sete. O teste *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para agrupar as médias e avaliar a diferença entre os tratamentos. Todos os testes de análises estatísticas foram realizados utilizando o pacote ExpDes do software R.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Componentes de adaptabilidade

Nos cinco componentes de adaptabilidade avaliados *in vitro* (crescimento micelial e produção de conídios) e *in vivo* (período de incubação, agressividade e produção de conídios) foi observada diferenças entre os isolados de *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes a QoI e SDHI.

*Crescimento micelial.* As taxas de crescimento micelial *in vitro* foram significativamente diferentes entre os isolados (Scott-Knott  $p \leq 0.05$ ). O crescimento micelial dos isolados sensíveis a QoI após 7 dias de incubação variou de 46,13 a 48,68 e para SDHI de 43,13 a 46,13, enquanto que, os isolados resistentes a QoI e SDHI, o crescimento variou de 43,13 a 50,35 e 48,68 a 50,35 mm, respectivamente (Tabela 2).

*Produção de conídios in vitro:* A produção média de conídios *in vitro* tanto entre os isolados sensíveis quanto os resistentes a QoI e SDHI foram significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2). O isolado Py6038 sensível a QoI e SDHI produziu maior número de conídios ( $2,22 \times 10^5$  conídios/mL) quando comparado aos isolados 12.127 sensível a QoI ( $2,87 \times 10^4$  conídios/mL) e 12.1.130 sensível a SDHI ( $1,80 \times 10^4$  conídios/ml). Um padrão semelhante foi observado para o isolado 12.1.146 resistente a QoI e SDHI produzindo  $2,24 \times 10^5$  conídios/mL, enquanto que isolado 12.1.127 resistente a QoI produziu ( $2,87 \times 10^4$  conídios/mL) e 12.1.130 resistente a SDHI produziu ( $1,80 \times 10^4$  conídios/ml).

*Período de incubação e virulência:* Os isolados sensíveis e resistentes a QoI e SDHI, foram patogênicos e causaram sintomas severos da doença em folhas e espigas de trigo cv Anahuac 75. Além disso, observamos a produção de conídios em lesões da doença presentes nas folhas. Os primeiros sintomas da doença em folhas de trigo surgiram aproximadamente 3 a 5 dias após a inoculação (dpi). Por outro lado, em espigas observamos os primeiros sintomas entre 5 e 7 dpi. O período de incubação entre os isolados sensíveis comparadas aos isolados resistentes a QoI e SDHI apresentaram diferenças significativas tanto em folhas quanto em espigas de trigo cv Anahuac 75 ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2 - Componentes de adaptabilidade dos isolados de *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes à QoI e SDHI.<sup>7</sup>

Isolados	Componentes de adaptabilidade <sup>a</sup>						
	Experimentos <i>in vitro</i>		Experimentos <i>in vivo</i>				
	Crescimento micelial (mm)	Esporulação (conídios/mL)	Período de incubação <sup>b</sup>		Virulência (%)		Esporulação (conídios/mL)
		Folha	Espiga	Folha	Espiga		
Py 6038	46,13 b	2,22 x 10 <sup>5</sup> a	4,33 a	6,50 a	30,06 b	30,97 c	9,25 x 10 <sup>2</sup> b
12.1.127	43,13 c	2,87 x 10 <sup>4</sup> b	4,00 b	6,00 b	14,67 c	50,96 b	3,25 x 10 <sup>2</sup> c
12.1.130	48,68 a	1,80 x 10 <sup>4</sup> b	4,00 b	6,00 b	10,66 c	57,07 b	5,50 x 10 <sup>2</sup> c
12.1.146	50,35 a	2,24 x 10 <sup>5</sup> a	3,83 b	5,75 b	43,55 a	63,69 a	2,42 x 10 <sup>3</sup> a

Legenda: <sup>a</sup> Valores médios dos componentes de adaptabilidade *in vitro* e *in vivo* dos isolados de *P. graminis-tritici* de dois experimentos. <sup>b</sup> O período de incubação foi determinado pelo número de dias que ocorreram o surgimento dos sintomas da brusone após a inoculação dos isolados *P. graminis-tritici* em folhas e espigas de trigo. Médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com análises de agrupamento (Scott-Knott  $p \leq 0.05$ ).

Fonte: Do autor (2019)

O isolado 12.1.146 resistente a QoI e SDHI causou primeiramente sintomas da doença em folhas e espigas de trigo 3,83 e 5,75 dpi, respectivamente, quando comparado ao isolado Py6038 sensível a QoI e SDHI cujo período de incubação em folhas e espigas de trigo foi de 4,33 e 6,50 dpi, respectivamente.

Figura 1 - Sintomas de brusone em folhas e espigas de trigo após inoculação de isolados de *P. graminis-tritici*.



Legenda: Plantas controle foram inoculadas com água destilada incrementada com o espalhante adesivo Tween 80 ( $10 \mu\text{l. L}^{-1}$ ). A e F: Plantas controle, B e G: Plantas inoculadas com isolado Py6038, QoI-S e SDHI-S. C e H: Plantas inoculadas com isolado 12.1.127, QoI-R e SDHI-S. D e I: Plantas inoculadas com isolado 12.1.130, QoI-S e SDHI-R. E e J: Plantas inoculadas com isolado 12.1.146, QoI-R e SDHI-R. Plantas foram avaliadas 7 dias após a inoculação (dpi). Barra de escala A-J: 10 mm. Fonte: Do autor (2019)

Nos testes de patogenicidade os isolados *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes a QoI e SDHI apresentaram diferenças significativas na virulência quando inoculados em plantas e espigas de trigo cv Anahuac 75 ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2 e Figura 1). O isolado 12.1.146 resistente à QoI e SDHI foi o mais virulento entre os isolados testados. Em plantas, 12.1.146 foi muito virulento causando 43,55 % de severidade em folhas de trigo, seguido pelo isolado Py6038 sensível a QoI e SDHI com 30,06% de severidade da doença. De forma semelhante, em espigas de trigo o isolado 12.1.146 também foi o mais virulento causando 63,69 % de severidade da doença, seguido pelos isolados 12.1.130 e 12.1.127 com 57,07 e 50,96 % de severidade, respectivamente. Em todos os testes, plantas ou espigas de trigo cv Anahuac 75 usadas como controle negativo e inoculadas com água deionizada incrementada com Tween, sintomas da doença não foram observados (Figura 1).

*Produção de conídios in vivo*: A esporulação do patógeno nos tecidos foliares de trigo foi o último teste de componentes de adaptabilidade testado. Diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ) na esporulação do patógeno nos tecidos foliares foram observados entre os isolados sensíveis e resistentes a QoI e SDHI (Tabela 2 e Figura 5D). Similarmente a produção de conídios *in vitro* o isolado 12.1.146 resistente a QoI e SDHI também apresentou maior produção média de conídios *in vivo* colhidos por saco homogeneizador ( $2,42 \times 10^3$  conídios colhidos/mL), seguido pelo isolado Py6038 sensível a QoI e SDHI ( $9,25 \times 10^2$  conídios colhidos/mL).

#### **4.2 Habilidade competitiva dos isolados de *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes na ausência de fungicida**

Após inoculações das misturas com inóculo inicial dos isolados 12.1.146 resistente (R) à QoI e SDHI e o isolado Py6038 sensível (S) observamos também altos níveis de severidade da doença em folhas e espigas de trigo além da produção de conídios nas folhas sintomáticas na ausência de fungicida (Figura 5D). Diferenças significativas foram encontradas entre as misturas de isolados inoculadas quanto a severidade da doença em folhas e espiga de trigo e na produção de conídios em folhas de trigo ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 3). A mistura 100R:0S foi a mais virulenta em folhas e espigas de trigo causando severidade de 43,55 e 68,73%, respectivamente, seguida pela

mistura 80R:20S que causou 40,91 e 61,54%, respectivamente. Em contrapartida, a mistura 100S:00R quando comparada à 100R:00S apresentou valores menores de severidade da doença tanto em folha quanto espigas de trigo, com 30,06 e 38,25%, respectivamente.

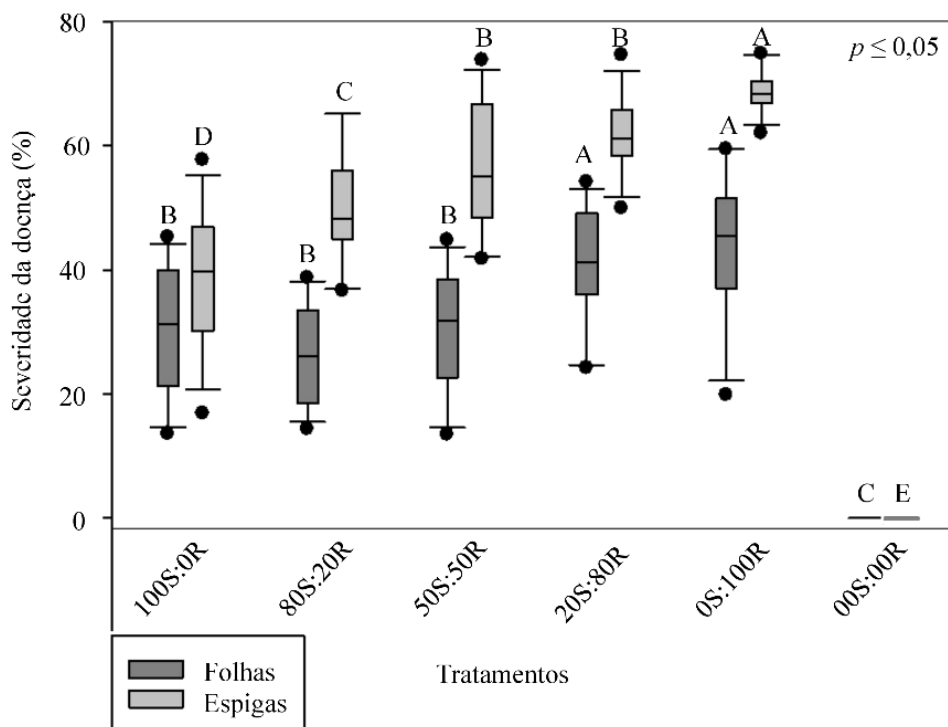
Figura 2 - Sintomas de brusone em folhas e espigas de trigo após inoculação das misturas de isolados *P. graminis-tritici* R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI.



Legenda: Plantas controle foram inoculadas com água destilada incrementada com o espalhante adesivo Tween 80 ( $10 \mu\text{l. L}^{-1}$ ). A e G: Plantas controle, B e H: Plantas inoculadas com mistura 100S:0R. C e I: Plantas inoculadas com mistura 80S:20R. D e J: Plantas inoculadas com mistura 50S:50R. E e K: Plantas inoculadas com mistura 20S:80R. F e L: Plantas inoculadas com a mistura 0S:100R. Plantas foram avaliadas 7 dias após a inoculação (dpi). Barra de escala A-L: 10 mm. Fonte: Do autor (2019)



Figura 3 - Boxplot da distribuição da virulência de *P. graminis-tritici* em folhas e espigas de trigo após a inoculação das misturas de isolados *P. graminis-tritici* R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI, 7 dias após a inoculação (dpi).



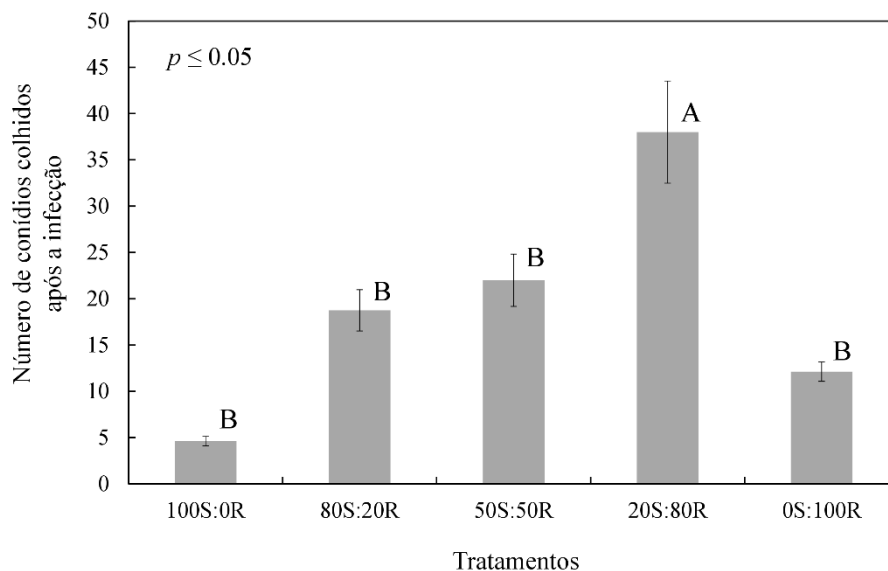
Legenda: Média de doença seguida pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com as análises de agrupamento (Scott-Knott  $p \leq 0.05$ ).

Fonte: Do autor (2019)

Na mistura 0:0 não foi constatada a presença de sintomas da doença em folhas e espigas de trigo (Figura 2). O mesmo comportamento foi verificado com relação ao número de conídios colhidos utilizando o saco homogeneizador em folhas de trigo sintomáticas (Figura 5E). Folhas de trigo inoculadas em misturas com maior proporção de conídios resistentes a QoI e SDHI apresentaram maior número de conídios colhidos das lesões sintomáticas quando comparada as folhas inoculadas com misturas com maior proporção de conídios sensíveis a QoI e SDHI.

O número de conídios colhidos das folhas de trigo inoculadas com as misturas 80R:20S e 100R:0S foram de 38,00 e 12,12; respectivamente. Por outro lado, as misturas 80S:20R e 100S:0R apresentaram 18,75 e 4,62 conídios colhidos, respectivamente. Na mistura 0:0 nenhum conídio foi colhido das folhas assintomáticas de trigo (Figura 4).

Figura 4 - Número total de conídios de *P. graminis-tritici* colhidos de folhas de trigo sintomáticas 21 dias após a inoculação (dpi) das misturas R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI.



Legenda: Média de doença seguida pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com as análises de agrupamento (Scott-Knott  $p \leq 0.05$ ).

Fonte: Do autor (2019)

### 4.3 Porcentagem de germinação *in vitro*

A porcentagem de germinação dos conídios produzidos de isolados sensíveis e resistentes a QoI e SDHI nas lesões das folhas de trigos coletados utilizando sacos homogeneizador com filtro foram significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 3 e Figura 5F). A amplitude entre a porcentagem de germinação conidial dos isolados e as misturas R:S de isolados de *P. graminis-tritici* em QoI e SDHI foram de 20 a 40% quando submetidos ao meio BD (Batata-dextrose) não suplementado com os fungicidas QoI e SDHI.

A porcentagem de germinação do isolado Py6038 sensível a QoI e SDHI foi menor em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  QoI (5,99%) e  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  SDHI (6,69%) quando comparado aos outros isolados analisados. Os isolados sensíveis a QoI e SDHI que apresentaram maior porcentagem de germinação foram 12.1.130 (10,38%) para QoI e 12.1.127 (17,03%)

para SDHI respectivamente. Em contrapartida, entre os isolados resistentes, o isolado 12.1.146 resistente a QoI e SDHI apresentou maior porcentagem de germinação quando submetido a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QoI (12,01%), enquanto, o isolado 12.1.130 resistente a SDHI e sensível a QoI apresentou maior porcentagem de germinação quando submetido a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SDHI (22,34%).

Tabela 3 - Porcentagem de germinação dos conídios sensíveis e resistentes a QoI e SDHI colhidas das folhas de trigo com lesões de brusone esporuladas 21 dias após a inoculação (dpi) dos isolados Py6038, 12.1.127, 12.1.130, 12.1.146 e das misturas R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI.

Tratamentos	Taxa de germinação (%)					
	Controle <sup>a</sup>		Azoxistrobina <sup>b</sup>		Fluxapiroxade <sup>c</sup>	
	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média
Py 6038 <sup>d</sup>	25-40	30,00 a	5-11	5,99 b	5-11	6,69 b
12.1.127	20-30	23,75 b	5-11	9,65 a	11-25	17,03 a
12.1.130	20-30	27,50 a	5-11	10,38 a	11-25	22,34 a
12.1.146 <sup>e</sup>	25-35	29,37 a	5-17	12,01 a	5-11	6,72 b
80S:20R	20-35	25,00 b	0-11	5,33 b	0-17	8,34 b
50R:50S	25-40	30,62 a	5-11	8,18 b	5-25	18,85 a
80R:20S	25-30	27,50 a	5-17	12,01 a	11-25	16,11 a

Legenda: <sup>a</sup> Porcentagem de germinação em meio BD (Batata-dextrose) contendo  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido salicil-hidroxiâmico (SHAM) sem os fungicidas QoI e SDHI. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com as análises de agrupamento (Scott-Knott  $p \leq 0.05$ ).

<sup>b</sup> Meio BD suplementado com  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QoI e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de (SHAM).

<sup>c</sup> Meio BD contendo  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SDHI e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de (SHAM).

<sup>d</sup> A porcentagem de germinação do isolado Py6038 equivale a mistura 100S:0R.

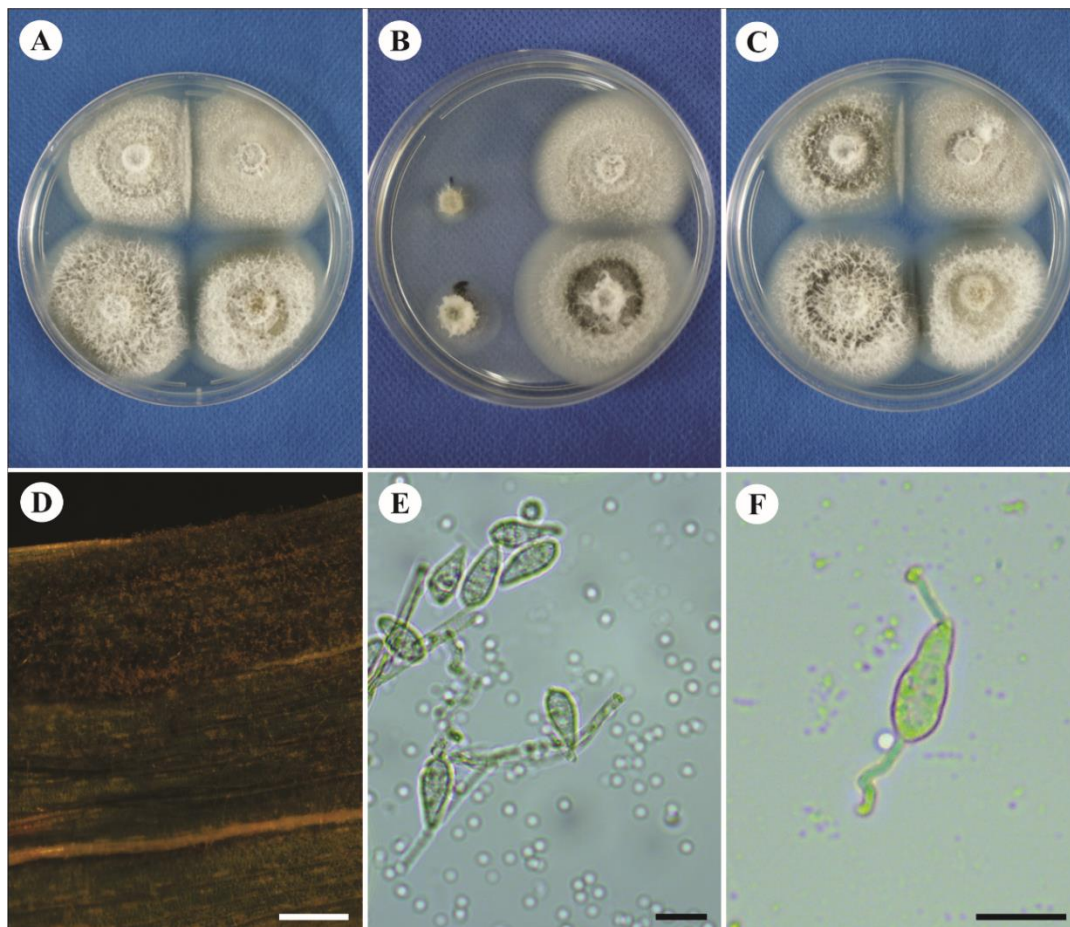
<sup>e</sup> A porcentagem de germinação do isolado 12.1.146 equivale a mistura 100R:0S.

Fonte: Do autor (2019)

Nos testes de habilidade competitiva, a maior porcentagem de germinação conidial nas folhas ocorreu para as misturas 100R:0S e 80R:20S quando em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QoI com 12,01 e 12,01 %, respectivamente, enquanto que as menores porcentagens de germinação ocorreram nas folhas inoculadas com misturas 100S:0R e 80S:20R com 5,99 e 5,33 %, respectivamente. Quando submetidas a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SDHI a maior porcentagem de germinação dos conídios ocorreu nas misturas 80R:20S e 50R:50S com

16,11 e 18,85%, respectivamente, ao passo que, conídios oriundos das misturas 100S:0R e 80S:20R apresentaram menores taxas de germinação sendo elas 6,69 e 8,34 %, respectivamente (Tabela 3).

Figura 5 - Teste de sensibilidade dos isolados de *P. graminis-tritici* submetidos a QoI e SDHI, esporulação *in vivo*, conídios coletados por saco homogeneizador e teste de germinação dos conídios de *P. graminis-tritici* em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QoI e  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SDHI.

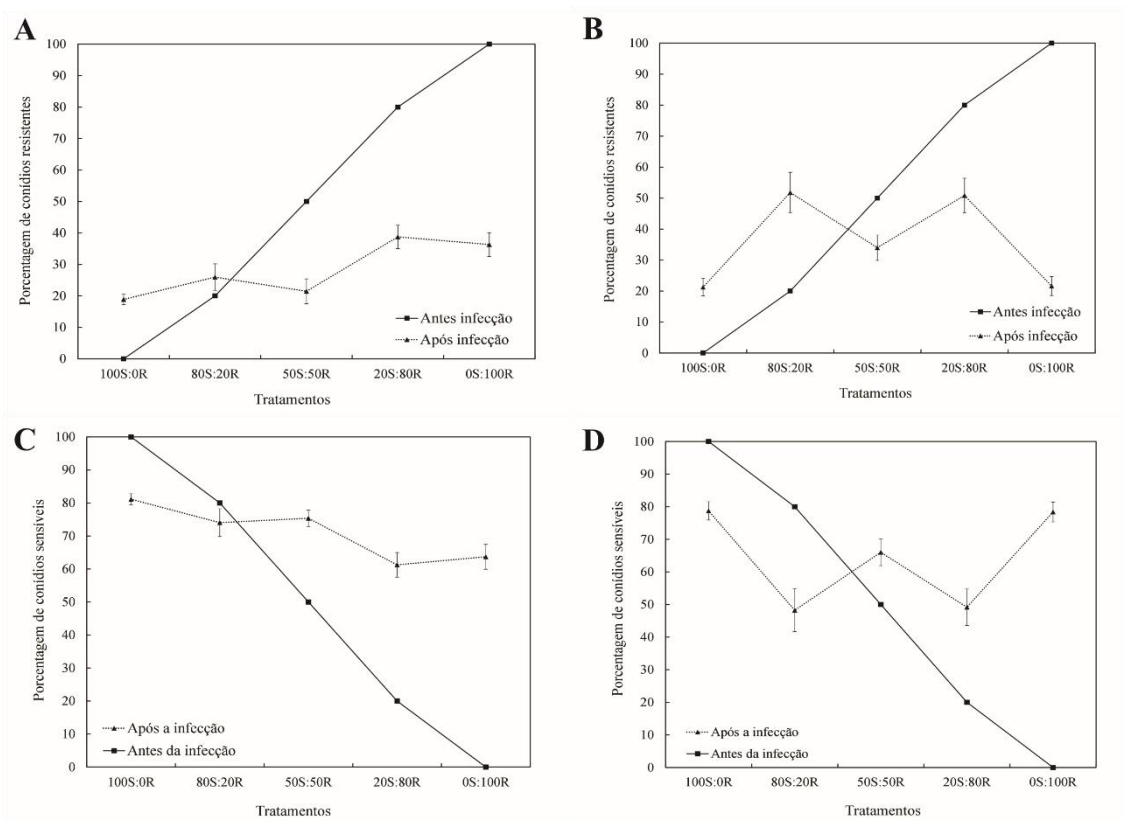


Legenda: A: Fotografia do crescimento micelial de *P. graminis-tritici* em meio BD (Batata-dextrose) contendo  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido salicil-hidroxiâmico (SHAM) sem os fungicidas QoI e SDHI. B: Crescimento micelial dos isolados de *P. graminis-tritici* em meio BD suplementado com  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QoI e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de (SHAM). C: Crescimento micelial dos isolados de *P. graminis-tritici* em meio BD suplementado com  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SDHI e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de (SHAM). D: Folha de trigo esporulando 21 dias após a inoculação (dpi) dos isolados de *P. graminis-tritici*. E: Fotomicrografia de conídios de *P. graminis-tritici* colhidos via saco homogeneizador com filtro após infecção dos isolados de *P. graminis-tritici* na ausência de fungicida. F: conídio de *P. graminis-tritici* germinado na presença de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QoI ou  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SDHI. Barra de escala D: 1 mm; E e F: 20  $\mu\text{m}$ . Fonte: Do autor (2019)

#### 4.4 Porcentagem de conídios de *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes colhidos das folhas sintomáticas de trigo

Os conídios colhidos das folhas de trigo após infecção na ausência de fungicida e submetidos a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QoI e  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SDHI apresentaram menores porcentagens de conídios sensíveis e resistentes nas misturas 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R quando comparada a com a mistura antes da inoculação nas folhas de trigo.

Figura 6 - Comparação entre a porcentagem de conídios sensíveis (S) e resistentes (R) de *P. graminis-tritici* antes e após a infecção das misturas R:S de 100S:0R, 80S:20R, 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R inoculadas em folhas de trigo; S representa isolado sensível a QoI e SDHI e R representa isolado resistente a QoI e SDHI.



Legenda: A: Porcentagem de conídios de *P. graminis-tritici* resistentes a QoI. B: Porcentagem de conídios de *P. graminis-tritici* resistentes a SDHI. C: Porcentagem de conídios de *P. graminis-tritici* sensíveis a QoI. D: Porcentagem de conídios de *P. graminis-tritici* sensíveis a SDHI. As barras de erro padrão estão indicadas nos gráficos.

Fonte: Do autor (2019)

Menores porcentagens de conídios resistentes foram observadas em folhas de trigo inoculadas com misturas 50S:50R, 20S:80R e 0S:100R quando comparada as misturas de inóculo inicial. A variação entre a porcentagem de conídios resistentes e sensíveis a QoI coletados das misturas R:S foram aproximadamente de 20 a 40 e 60 a 80%, respectivamente, enquanto que para SDHI foram aproximadamente de 20 a 50 e 50 a 80%, respectivamente (Figura 6).

#### 4.5 Determinação da atividade fotossintética e o teor de clorofilas

A inoculação dos isolados *P. graminis-tritici* e misturas de isolados R:S a QoI e SDHI provocaram redução dos teores de clorofila *a*, *b* e total em plantas de trigo em função do decorrer dos dias após a inoculação (dpi) somada a virulência dos isolados causando sintomas severos da doença nas folhas de trigo. Para os teores de clorofila *a*, *b* e total não houve diferença significativa entre os tratamentos 0 e 3 dpi, somente para 7 dpi ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 4). Plantas inoculadas com o isolado 12.1.146 resistente a QoI e SDHI e as misturas 50S:50R e 20S:80R apresentou teores reduzidos de clorofila *a*, *b* e total 7 dpi quando comparados aos demais tratamentos inclusive ao tratamento controle inoculado somente com água deionizada.

A redução de clorofila *a* nos tratamentos 0S:100R, 50S:50R e 20S:80R quando comparado ao controle foram de 42,1; 42,1 e 47,36 %, respectivamente. Similarmente, o teor de clorofila *b* em relação ao controle para os tratamentos, 50S:50R e 20S:80R teve redução de 57,63; 53,38 e 58,47 %, respectivamente, enquanto que para clorofila total a redução foi de 55,79; 51,45 e 56,52%, respectivamente. O teor de clorofila *a*, *b* e total em plantas inoculadas com o isolado Py6038 sensível a QoI e SDHI não apresentaram diferenças significativas em relação as plantas controle.

A atividade fotossintética das plantas de trigo quando inoculadas com isolados de *P. graminis-tritici* sensíveis e resistentes a QoI e SDHI e mistura de isolados R:S apresentou diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre os tratamentos com 0, 3 e 7 dpi (Tabela 4). Ocorreu um aumento nos teores fotossintéticos das plantas aos 3 dpi quando comparado a 0 dpi na maioria dos tratamentos avaliados. No entanto, houve redução da atividade fotossintética de 39,94 % 7 dpi do isolado 0S:100R resistente a QoI e SDHI

quando comparada as plantas controle inoculadas com água destilada. Em contrapartida, a atividade fotossintética das plantas inoculadas com o isolado Py6038 sensível a QoI e SDHI não apresentaram diferenças significativas em relação com as plantas controle. Plantas inoculadas com misturas 80S:20R e 50S:50R também apresentaram atividade fotossintética reduzidas aos 7 dpi e diferiram estatisticamente das plantas controle, com exceção das plantas inoculadas com a mistura 20S:80R.

Tabela 4 - Atividade fotossintética e o teor de clorofilas *a*, *b* e total das plantas de trigo inoculadas com isolados de *P. graminis-tritici* e misturas de isolados sensíveis e resistentes à QoI e SDHI.

Tratamentos	0 dias			Fotossíntese <sup>b</sup>	3 dias			Fotossíntese	7 dias			Fotossíntese
	Clorofila <sup>a</sup>				Clorofila				Clorofila			
	<i>A</i>	<i>B</i>	total		<i>a</i>	<i>b</i>	total		<i>a</i>	<i>b</i>	total	
Py 6038 <sup>c</sup>	0,024 a	0,144 a	0,169 a	1,967 b	0,022 a	0,137 a	0,160 a	2,860 b	0,019 a	0,123 a	0,143 a	2,830 a
12.1.127	0,023 a	0,142 a	0,166 a	2,232 b	0,023 a	0,141 a	0,165 a	2,095 b	0,016 b	0,107 b	0,124 b	1,780 b
12.1.130	0,025 a	0,153 a	0,179 a	2,005 b	0,023 a	0,142 a	0,166 a	3,070 b	0,019 a	0,119 a	0,138 a	1,807 b
12.1.146 <sup>d</sup>	0,024 a	0,147 a	0,172 a	2,180 b	0,024 a	0,147 a	0,172 a	3,895 a	0,008 c	0,068 c	0,077 c	1,397 b
80S:20R	0,025 a	0,152 a	0,178 a	2,957 a	0,024 a	0,143 a	0,167 a	3,527 a	0,016 b	0,104 b	0,121 b	2,440 b
50S:50R	0,024 a	0,143 a	0,168 a	2,907 a	0,021 a	0,133 a	0,155 a	4,197 a	0,008 c	0,063 c	0,071 c	2,037 b
20S:80R	0,025 a	0,152 a	0,178 a	2,927 a	0,023 a	0,140 a	0,164 a	3,542 a	0,009 c	0,069 c	0,078 c	3,167 a
Controle	0,027 a	0,158 a	0,185 a	3,835 a	0,024 a	0,145 a	0,170 a	2,552 b	0,019 a	0,118 a	0,138 a	3,497 a

Legenda: <sup>a</sup> Valores médios dos teores de clorofila *a*, *b* e total das plantas de trigo inoculadas com isolados e misturas de isolados de *P. graminis-tritici* de dois experimentos. Plantas do tratamento controle foram inoculadas somente com água deionizada. Médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com análises de agrupamento (Scott-Knott  $p \leq 0,05$ ).

<sup>b</sup> Valores médios dos teores fotossintéticos ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

<sup>c</sup> Atividade fotossintética e teor de clorofila *a*, *b* e total do isolado Py6038 que equivale a mistura 100S:0S.

<sup>d</sup> Atividade fotossintética e teor de clorofila *a*, *b* e total do isolado 12.1.146 que equivale a mistura 0S:100R



## 5 DISCUSSÃO

Embora autores tenham citado pouca eficiência adaptativa de fungos resistentes a QoI com a mutação G143A no gene do citocromo b (*cytb*), nesse trabalho houve uma maior eficiência adaptativa do isolado *P. graminis-tritici* resistente comparado ao sensível. A mutação é a principal fonte de variação genética para que mudanças evolutivas ocorram (HARTL e CLARK, 2007). No contexto evolucionário, uma mutação *de novo* origina-se uma vez que uma mudança ambiental tenha ocorrido tornando essa mutação seletivamente vantajosa, e ocorre sob essa seleção (MESSER e PETROV, 2013). No ponto de vista adaptativo nossos resultados apontam de forma surpreendente para uma vantagem adaptativa oriundo da mutação G143A no isolado *P. graminis-tritici* resistente comparado ao isolado sensível.

Para os componentes de adaptabilidade o isolado 12.1.146 resistente a QoI e SDHI foi mais virulento em folhas e espigas de trigo comparado ao isolado Py6038 sensível. Além disso, o período de incubação associado ao isolado resistente foi menor, para folhas e espigas. O isolado resistente também apresentou maior capacidade na produção de conídios em tecidos foliares colhidos quando comparado ao sensível. Isolados de *Alternaria alternata* resistentes a QoI com a mutação G143A também foram mais virulentos que isolados selvagens sensíveis em plantas de pistache, de acordo com Karaoglanidis et al. (2011). No entanto, estes autores verificaram que o período de incubação da doença e a produção de conídios *in vivo* de *A. alternata* não diferiram entre isolados resistente e sensível. Por outro lado, isolados de *Botrytis cinerea* resistentes a múltiplas classes químicas de fungicidas, inclusive QoI, foram tão virulentos quanto aqueles sensíveis, e não diferiram na produção de conídios em folhas de maçã (CHEN et al., 2016). Em contrapartida, isolados com mutação G143A de *Pyricularia oryzae* de azevém-perene foram menos virulentos que os isolados selvagens (MA e UDDIN, 2009). A mutação G143A relatadas para outros patógenos inclusive para *P. graminis-tritici* não é importante no patossistema *Phakopsora pachyrhizi* da soja. A mutação F129L foi a única detectada no gene *cytb* relacionada a resistência de *P. pachyrhizi* a QoI (KLOSOWSKI et al., 2016). Assim, a mutação G143A pode interferir diferencialmente na adaptabilidade de diferentes patossistemas.

A virulência dos isolados pode estar algumas vezes relacionada com a redução do teor de clorofilas das plantas, uma vez que a partir do surgimento de sintomas foliares como necrose, a atividade fotossintética é reduzida por efeito da grande destruição das moléculas de clorofilas nos locais com sintomas (PASCHOLATI e DALIO, 2018). Em nosso estudo os isolados de *P. graminis-tritici* provocaram a redução do teor de clorofilas e da taxa fotossintética em plantas de trigo 7 dias após a inoculação (dpi) somada a altos níveis de virulência nas folhas sintomáticas. Além de ser mais virulento, o isolado 12.1.146 resistente a QoI e SDHI também provocou maior redução dos teores de clorofila *a*, *b* e total e da atividade fotossintética das plantas de trigo quando comparado ao isolado sensível. Esses resultados confirmam as evidências de (JADÃO et al., 2004), os quais encontraram teores de clorofilas e atividade fotossintética de alfaves reduzidas após as plantas serem infectadas com os patótipos II e IV *Lettuce mosaic virus* (LmV) e *Lettuce mottle virus* (LeMoV).

A produção de conídios *in vitro* do isolado resistente foi semelhante ao isolado sensível como também observado para *A. alternata* (KARAOGLANIDIS et al., 2011). Entretanto, o crescimento micelial *in vitro* do isolado resistente foi maior quando comparado ao isolado sensível.

As diferenças encontradas entre os isolados sensíveis e resistentes de *P. graminis-tritici* em nosso estudo sugere que possa existir a seleção de isolados altamente resistentes a QoI e SDHI com alta adaptabilidade nos campos de trigo, como já relatado para isolados de *A. alternata* oriundos de pistache (KARAOGLANIDIS et al., 2011) e para isolados de *Colletotrichum acutatum* do morangueiro (FORCELINI et al., 2018). As diferenças observadas na adaptabilidade dependem de quais componentes de adaptabilidade são mensurados e quais condições de crescimento são utilizadas, mesmo quando corrigidas por antecedentes genéticos, e tornam a aplicação de diferentes medidas de adaptabilidade as condições de campos mais complexas (HAWKINS e FRAAIJE, 2018).

Os experimentos para avaliação da habilidade competitiva realizados em folhas e espigas de trigo inoculados com diferentes misturas de isolados resistente e sensível na ausência de pressão de seleção mostraram que o isolado resistente produziu maior número de conídios nas folhas de trigo comparado ao isolado sensível. Ma e Uddin (2009) também relataram maior produção de conídios por área de lesão da doença do

isolado mutante em relação ao selvagem. A infecção simultânea de folhas de trigo por um isolado resistente e sensível na ausência de fungicida resultou no aumento de conídios resistentes e um decréscimo de conídios sensíveis nas misturas de 80S:20R, 50S:50R e 20S:80R. Quando os isolados sensível e resistente coexistem, há uma vantagem competitiva do isolado resistente sobre o sensível nas condições testadas, indicando ausência de custo adaptativo no isolado resistente a QoI e SDHI.

Esses resultados confirmam a ausência de custo adaptativo em isolados *P. graminis-tritici* resistentes a QoI, apresentando crescimento micelial, esporulação, patogenicidade e habilidade competitiva normais. Isto também ocorre para *Plasmopora viticola* (DELMAS et al., 2017), *Erysiphe graminis f. sp. tritici* (CHIN et al., 2001) e *Pyricularia grisea* (AVILA-ADAME e KOLLER, 2003), os quais apresentam mutação G143A, e em *P. pachyrhizi*, com a mutação F129L (KLOSOWSKI et al., 2016; MAY DE MIO et al., 2018). Entretanto, eles estão em contraste às evidências de outros relatos onde é sugerido o custo adaptativo de G143A em isolados QoI resistentes, como redução da virulência de isolados de *Pyricularia oryzae* (MA e UDDIN, 2009) e *Zymoseptoria tritici* (HAGERTY e MUNDT, 2016) obtidos do campo. Observou-se crescimento e patogenicidade reduzidos em mutantes de laboratório de *Cercospora beticola* com as mutações G143S e F129V (MALANDRAKIS et al., 2006) e alguns mutantes resistentes de *Ustilago maydis* (ZIOGAS et al., 2002).

Nossos resultados apontam ausência de custo adaptativo de isolado *P. graminis-tritici* resistente a SDHI. Neste caso, a resistência não está associada a mutações em quaisquer um dos três genes que codificam os componentes alvos do complexo SDH (*sdh* B, C e D), mas provavelmente devido a alterações na atividade de bombas de efluxo (HAWKINS e FRAAIJE, 2018). Isolados de campo de *Zymoseptoria tritici* possuem mutações MDR que proporcionam super-expressão de genes codificantes para bombas de efluxo (OMRANE et al., 2015). Uma super-expressão no gene *MgMFS1* como um fator de contribuição foi identificada, porém todos os mecanismos que conferem MDR ainda não foram elucidados (OMRANE et al., 2015).

O principal resultado deste estudo foi evidenciar a vantagem adaptativa em isolados de *P. graminis-tritici* resistentes a QoI oriundo pela mutação G143A e SDHI por alterações na atividade de bomba de efluxo. Assim, isolados de *P. graminis-tritici* resistente a QoI e SDHI são mais adaptados que os sensíveis. Isto pode causar impactos

significativos nos atuais cenários dos programas de manejo da brusone em trigo. A necessidade de estratégias anti-resistência de isolados *P. graminis-tritici* a QoI e SDHI são evidentes e devem direcionar-se para retardar a frequência de isolados resistentes e diminuição das taxas de isolados resistentes. A aplicação de fungicidas pertencentes a diferentes classes químicas poderia ser uma estratégia anti-resistência. Uma vez que a resistência de *P. graminis-tritici* a QoI e SDHI se desenvolveu em alta frequência nos campos de trigo e não está associada com um alto custo adaptativo, o uso de QoI ou SDHI em misturas seleciona para resistência, e o fungicida ocasionalmente torna-se não funcional (ISHII, H. e HOLLomon, D. W., 2015). Uma estratégia visando reduzir o risco dos isolados de *P. graminis-tritici* tornar-se resistentes a SDHI, seria a aplicação de SDHI em misturas com fungicidas de baixo risco como o mancozeb e o clorotalonil nos campos de trigo (VAN DEN BOSCH et al., 2014).

Outras estratégias visando o manejo integrado da brusone do trigo podem ser empregadas como produtos biológicos e fungicidas não sintético. A aplicação de agentes de biocontrole tem se mostrado eficaz no controle da brusone do arroz e poderá ser testada contra brusone do trigo para verificar sua eficiência. *Bacillus methylotrophics*, *Trichoderma harzianum* e *Chaetomium globosum* podem ser agentes potenciais para biocontrole da brusone do trigo devido suas habilidades em reduzir os sintomas da brusone em arroz (PARK et al., 2005; SINGH et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). O uso de fungicidas não-químicos como fosfato de potássio e silicato de potássio foram capazes de reduzir a severidade da brusone em três cultivares de trigo e o crescimento fúngico *in vitro*, respectivamente (CRUZ et al., 2011). A aplicação de silício pode aumentar a expressão de genes relacionado a defesa da planta. A colonização de *P. graminis-tritici* em folhas de trigo pode ser limitada por meio da potencialização da via biossintética dos flavonoides e pela deposição de compostos fenólicos na folha de trigo (CRUZ et al., 2011; CRUZ, DEBONA, et al., 2015; CRUZ, SILVA, et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Estudos futuros sobre a estabilidade da mutação G143A no gene *cytb* em isolados de *P. graminis-tritici* resistentes a QoI e SDHI poderá fornecer informações adicionais sobre a permanência ou não da ausência de custo adaptativo em isolados de *P. graminis-tritici* resistentes após ciclos da doença.

## 6 CONCLUSÕES

O isolado de *Pyricularia graminis-tritici* resistente a QoI e SDHI: (i) apresentou uma vantagem adaptativa quando comparado ao isolado sensível, (ii) exibiu maior adaptabilidade competitiva em comparação ao isolado sensível sob as condições testadas e (iii) sua virulência reduziu a atividade fotossintética e os teores de clorofila *a*, *b* e total das plantas de trigo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen *fitness*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 547–556, 2005.

AVENOT, H. F.; MICHAILIDES, T. J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 29, n. 7, p. 643-651, 2009.

AVILA-ADAME, C.; KOLLER, W. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. **Current Genetics**, v. 42, n. 6, p. 332–338, 2003.

CASADO, P. S. **Validation of the microplate method and studies on resistance to the fungicide fluxapyroxad in populations of *Pyricularia graminis-tritici* in Brazil**. 2017. 53 (MSc Dissertation). University of São Paulo State, Ilha Solteira, São Paulo.

CASTROAGUDIN, V. L. et al. Resistance to QoI Fungicides Is Widespread in Brazilian Populations of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, v. 105, n. 3, p. 284-94, Mar 2015.

CASTROAGUDIN, V. L. et al. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 37, p. 199–216, 2016.

CERESINI, P. C. et al. Wheat Blast: Past, Present, and Future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 427-456, 2018a.

CERESINI, P. C. et al. Wheat blast: from its origins in South America to its emergence as a global threat. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 1-18, 2018b.

CHAPARA, V. et al. Competitive Parasitic Fitness of Mefenoxam-Sensitive and -Resistant Isolates of *Phytophthora erythroseptica* under Fungicide Selection Pressure. **Plant Disease**, v. 95, n. 6, p. 691-696, 2011.

CHEN, S. N. et al. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* isolates with resistance to multiple chemical classes of fungicides. **Phytopathology**, v. 106, p. 997-1005, 2016.

CHIN, K. M. et al. Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* to strobilurins. **Crop Protection**, v. 20, p. 87-96, 2001.

COUCH, B. C. et al. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, v. 170, n. 2, p. 613-30, Jun 2005.

COUCH, B. C.; KOHN, L. M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia**, v. 94, n. 4, p. 683–693, 2002.

- COX, K. D.; BRYSON, P. K.; SCHNABEL, G. Instability of Propiconazole Resistance and Fitness in *Monilinia fructicola*. **Disease Control and Pest Management**, v. 97, p. 448-453, 2007.
- CRUZ, C. D. et al. Preliminary Assessment of Resistance Among U.S. Wheat Cultivars to the *Triticum* Pathotype of *Magnaporthe oryzae*. **Plant Disease**, v. 96, p. 1501-1505, 2012.
- CRUZ, M. F. A. et al. Potentiation of defense-related gene expression by silicon increases wheat resistance to leaf blast. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 394-400, 2015.
- CRUZ, M. F. A. et al. Foliar application of products on the reduction of blast severity on wheat. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 424-428, 2011.
- CRUZ, M. F. A. et al. Microscopic aspects of the colonization of *Pyricularia oryzae* on the rachis of wheat plants supplied with silicon. **Bragantia**, v. 42, p. 207-214, 2015.
- DELMAS, C. E. L. et al. Soft selective sweeps in fungicide resistance evolution: recurrent mutations without fitness costs in grapevine downy mildew. **Molecular Ecology**, v. 26, p. 1936–1951, 2017.
- DUVEILLER, E. A History of Wheat. **World Wheat Book**, v. 3, p. 1107, 2016.
- DUVEILLER, E.; HODSON, D.; TIEDMANN, A. Wheat blast caused by *Magnaporthe grisea*: a reality and new challenge for wheat research. International wheat conference, 2010, St. Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry Conference. p.247-248.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International microbiology**, v. 11, p. 1-9, 2008.
- FORCELINI, B. B. et al. Fitness, competitive ability, and mutation stability of isolates of *Colletotrichum acutatum* from strawberry resistant to QoI fungicides. **Disease Control and Pest Management**, v. 108, p. 462-468, 2018.
- FRAC, F. R. A. C. S.-. FRAC-pathogen-risk-list. 2014. Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=8>>. Acesso em: 18/01/2017.
- GISI, U. et al. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 859-67, Sep 2002.
- GOMES, D. P. et al. Damage of wheat blast on the productivity and quality of seeds as a function of the initial inoculum in the field. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 66-74, 2017.
- GOULART, A. C. P.; NASSER, L. C. B.; AZEVEDO, J. A. D. Manejo integrado de doenças em trigo irrigado sob pivô central na região do cerrado. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 358-363, 2007.

- GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A. Perdas no rendimento de grãos de trigo causadas por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica** v. 26, p. 279-282, 2000.
- GRASSO, V. et al. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 62, n. 6, p. 465-72, Jun 2006.
- HAGERTY, C. H.; MUNDT, C. C. Reduced virulence of azoxystrobin-resistant *Zymoseptoria tritici* populations in greenhouse assays. **Genetics and Resistance**, v. 106, p. 884-889, 2016.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. 2007.
- HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 16.1–16.22, 2018.
- HOBBELEN, P. H.; PAVELEY, N. D.; VAN DEN BOSCH, F. Delaying selection for fungicide insensitivity by mixing fungicides at a low and high risk of resistance development: a modeling analysis. **Phytopathology**, v. 101, n. 10, p. 1224-33, Oct 2011.
- HU, J. H. et al. Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. **Plant Pathology**, v. 57, p. 728-736, 2008.
- IGARASHI, S. Ocorrência de *Pyricularia* spp. no estado do Paraná. **Fitopatologia brasileira**, v. 11, p. 351-352 1986.
- ISHII, H.; HOLLomon, D. W. **Fungicide Resistance in Plant Pathogens Principles and a Guide to Practical Management**. Springer Japan, 2015. 490 ISBN 978-4-431-56301-3.
- ISHII, H.; HOLLomon, D. W. Fungicide Resistância in Plant Pathogens Principles and a Guide to Practical Management. p. 1-489, 2015.
- ISLAM, M. T. et al. Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. **BMC Biol**, v. 14, n. 1, p. 84, Oct 3 2016.
- JABS, T.; CRONSHAW, K.; FREUND, A. New strobilurin resistance mechanism in apple scab (*Venturia inaequalis*). **Phytopathology**, v. 31, p. 15-16, 2001.
- JADÃO, A. S. et al. Efeitos na fotossíntese e área foliar de cultivares de alface inoculadas mecanicamente com patótipos do *Lettuce mosaic virus* e Lettuce mottle virus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 011-015, 2004.
- JEGER, M. J.; WIJNGAARDEN, P. J.; HOEKSTRA, R. F. Adaptation to the cost of resistance in a haploid clonally reproducing organism: the role of mutation, migration and selection. **Journal of Theoretical Biology** v. 252, p. 621-632, 2008.



- KARAOGLANIDIS, G. S.; LUO, Y.; MICHAILEDIS, T. J. Competitive Ability and Fitness of *Alternaria alternata* Isolates Resistant to QoI Fungicides. **Plant Disease**, v. 95, n. 2, p. 178-182, 2011.
- KARAOGLANIDIS, G. S.; THANASSOULOPOULOS, C. C.; IOANNIDIS, P. M. Fitness of *Cercospora beticola* field isolates – resistant and – sensitive to demethylation inhibitor fungicides. **Europe Journal Plant Pathology**, v. 107, p. 337-347, 2001.
- KIM, Y. K.; XIAO, C. L. Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. **Phytopathology**, v. 101, n. 11, p. 1385-91, Nov 2011.
- KLAUBAUF, S. et al. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). **Studies in Mycology**, v. 79, p. 85-120, Sep 2014.
- KLOSOWSKI, A. C. et al. Detection of the F129L mutation in the cytochrome *b* gene in *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest Manag Science**, v. 72, p. 1211–1215, 2016.
- LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The evolution of fungicide resistance. **Adv Appl Microbiol**, v. 90, p. 29-92, 2015.
- MA, B.; UDDIN, W. Fitness and Competitive Ability of an Azoxystrobin-Resistant G143A Mutant of *Magnaporthe oryzae* from *Perennial Ryegrass*. **Plant Disease**, v. 93, n. 10, p. 1044-1049, 2009.
- MA, Z.; MICHAILEDIS, T. J. Characterization of iprodione-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 80, p. 75-84, 2004.
- MA, Z.; MICHAILEDIS, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, p. 853–863, 2005.
- MACIEL, J. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, n. 050, 2011.
- MACIEL, J. L. et al. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, v. 104, n. 1, p. 95-107, Jan 2014.
- MALAKER, P. K. et al. First report of wheat blast caused by *Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum* in Bangladesh. **Plant Disease**, 2016.
- MALANDRAKIS, A. A. et al. Biological and molecular characterization of laboratory mutants of *Cercospora beticola* resistant to Qo inhibitors. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, p. 155–166, 2006.
- MALANDRAKIS, A. A. et al. Characterization of boscalid-resistance conferring mutations in the SdhB subunit of respiratory complex II and impact on fitness and

mycotoxin production in *Penicillium expansum* laboratory strains. **Pestic Biochem Physiol**, v. 138, p. 97-103, May 2017.

MAPA, M. D. A. P. E. A.-. Agrofit - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários, Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins. 2019. Disponível em: < [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) >. Acesso em: 15 Janeiro 2019.

MAY DE MIO, L. L.; KLOSOWSKI, A. C.; MÜLLER, M. A. **XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas: biotecnologia aplicada a fitopatologia - Ferrugem asiática da soja: estudos sobre a sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. Lavras: 2018. 201.

MESSER, P. W.; PETROV, D. A. Population genomics of rapid adaptation by soft selective sweeps. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, p. 659-669, 2013.

MIYAMOTOA, T. et al. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. **Plant Pathology**, v. 59, p. 873–881, 2010.

MURAKAMI, J.; TOMITA, R.; KATAOKA, T. Analysis of host species specificity of *Magnaporthe grisea* toward foxtail millet using a genetic cross between isolates from wheat and foxtail millet. **Phytopathology**, v. 93, p. 42-45, 2003.

OLAYA, G.; ZHENG, D.; KOLLER, W. Differential Responses of Germinating *Venturia inaequalis* Conidia to Kresoxim-methyl. **Pestic. Sci**, v. 54, p. 230-236, 1998.

OLIVEIRA, S. C. et al. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 298-304, 2015.

OMRANE, S. et al. Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. **Environmental Microbiology**, v. 17, p. 2805–2823, 2015.

OU, S. H. **Rice diseases**. 2. Kew, UK.: Commonwealth Mycological Institute, 1985. 380.

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** v. 42, p. 609–617, 2014.

PARK, J. H. et al. Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 309–313, 2005.

PARNELL, S.; GILLIGAN, C. A.; VAN DEN BOSCH, F. Small-Scale Fungicide Spray Heterogeneity and the Coexistence of Resistant and Sensitive Pathogen Strains. **Phytopathology**, v. 95, p. 632-639, 2005.

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

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. **Fisiologia do parasitismo: Como os patógenos atacam as plantas**. São Paulo: 2018.

PEEVER, T. L.; MILGROOM, M. G. Fungicide resistance: lessons for herbicide resistance management. **Weed Technology**, v. 9, p. 840-849, 1995.

POLONI, N. M. **Widespread distribution of triazole fungicide resistance and evolution of the cyp51A gene in populations of the wheat blast pathogen *Pyricularia oryzae* in Brazil**. 2016. 44 (MSc Dissertation). University of São Paulo State, UNESP, Ilha Solteira.

PRINGLE, A.; TAYLOR, J. W. The fitness of filamentous fungi. **Trends Microbiol**, v. 10, p. 474–481, 2002.

SCALLIET, G. et al. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35429, 2012.

SCHOUSTRA, S. E. et al. Comparing artificial and natural selection in rate of adaptation to genetic stress in *Aspergillus nidulans*. **Journal Evolutionary Biology**, v. 18, p. 771–778, 2005.

SIEROTZKI, H.; SCALLIET, G. A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. **Phytopathology**, v. 103, n. 9, p. 880–887, 2013.

SILVA, H. L. D. et al. Histochemical aspects of wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. **Scientia Agricola**, v. 72, p. 322-327, 2015.

SINGH, P. K. et al. Biological control of rice blast disease with *Trichoderma harzianum* in direct seeded rice under medium low land rainfed conditions. **Environment and Ecology**, v. 30, p. 834-837, 2012.

SUZUKI, F. et al. Changes in fungicide resistance frequency and population structure of *Pyricularia oryzae* after discontinuance of MBI-D fungicides. **Plant Disease**, v. 94, p. 329–334, 2010.

TAKABAYASHI, N. et al. A Gene-for-Gene Relationship Underlying the Species-Specific Parasitism of Avena/Triticum Isolates of *Magnaporthe grisea* on Wheat Cultivars. **Phytopathology**, v. 92, n. 11, p. 1182-1188, 2002.

URASHIMA, A.; KATO, H. Pathogenic Relationship Between Isolates of *Pyricularia grisea* of Wheat and Other Hosts at Different Host Developmental Stages. **Fitopatologia brasileira**, v. 23, p. 30-35, 1998.

URASHIMA, A. S. et al. Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homolog of retrotransposon MGR583. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 65, p. 429-436, 1999.

URASHIMA, A. S. et al. Resistance Spectra of Wheat Cultivars and Virulence Diversity of *Magnaporthe grisea* Isolates in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 511-518, 2004.

VALENT, B.; BOCKUS, W.; CRUZ, C. Recovery plan for wheat blast caused by *Magnaporthe oryzae* *Triticum* pathotype. **USDA National Plant Disease Recovery System**, 2013.

VAN DEN BOSCH, F. et al. Mixtures as a fungicide resistance management tactic. **Phytopatology**, p. 1264-1273, 2014.

VELOUKAS, T. et al. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. **Disease Control and Pest Management**, v. 104, n. 4, p. 347-356, 2014.

VILLANI, S. M.; COX, K. D. Heteroplasmy of the cytochrome b gene in *Venturia inaequalis* and its involvement in quantitative and practical resistance to trifloxystrobin. **Phytopathology**, v. 104, n. 9, p. 945-53, Sep 2014.

WOOD, P. M.; HOLLOMON, D. W. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Q(o) site of Complex III. **Pest Manag Science**, v. 59, p. 499–511, 2003.

WORRALL, J. J. **Structure and dynamics of fungal populations**. 1999. ISBN 978-94-011-4423-0.

ZADOCKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, p. 415–421, 1974.

ZHANG, C. Q. et al. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. **Crop Protection**, v. 28, p. 381 e 386, 2009.

ZIOGAS, B. N.; MARKOGLU, A. N.; TZIMA, A. A non-Mendelian inheritance of resistance to strobilurin fungicides in *Ustilago maydis*. **Pest Management Science**, v. 58, p. 908–916, 2002.