

Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil

Samanta Cristiene de Oliveira¹, Vanina Lilián Castroagudín¹, João Leodato Nunes Maciel², Danilo Augusto dos Santos Pereira¹, Paulo Cezar Ceresini¹.

¹UNESP (Universidade Estadual Paulista), Campus de Ilha Solteira, Depto. Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos; ²EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) - Trigo, Passo Fundo, RS.

Autor para correspondência: Paulo Cezar Ceresini (pauloceresini@yahoo.com)

Data de chegada: 21/01/2015. Aceito para publicação em: 18/06/2015.

10.1590/0100-5405/2072

RESUMO

Oliveira, S.C.; Castroagudín, V.L.; Maciel, J.L.N.; Pereira, D.A.S.; Ceresini, P.C. 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.

As estrobilurinas estão entre os fungicidas mais comumente utilizados no controle das doenças do trigo, isoladamente ou em misturas com fungicidas inibidores da enzima succinato desidrogenase (IDHS). As estrobilurinas são conhecidas como fungicidas inibidores da quinona oxidase ou fungicidas IQo. Por ter como alvo um único sítio de ação nas células fúngicas, o gene mitocondrial *cyt b*, o emprego contínuo das estrobilurinas pode representar alto risco de emergência de resistência a estes fungicidas em populações de fitopatógenos. O presente trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que a resistência a azoxistrobina no fungo *Pyricularia oryzae* do trigo resultou em resistência cruzada a piraclostrobina, outro fungicida IQo. Para testar esta hipótese, foi comparado o nível de resistência à piraclostrobina apresentado por dois grupos de isolados do fungo *P. oryzae* do trigo: a) sensíveis à azoxistrobina

e portadores do gene *cyt b* não mutante (haplotipo H9) e b) resistentes à azoxistrobina e portadores da mutação G143A no gene *cyt b* (haplotipo H1). Fungicidas pertencentes a um mesmo grupo químico apresentam resistência cruzada. Todos os isolados de *P. oryzae* do trigo sensíveis à azoxistrobina foram também sensíveis à piraclostrobina. Os isolados resistentes a azoxistrobina foram, também, resistentes à piraclostrobina, indicando que há resistência cruzada para os dois fungicidas. Entre os isolados resistentes, distinguiram-se dois grupos fenotípicos: (A) altamente resistentes e (B) resistentes. Isolados de *P. oryzae* com a presença da mutação G143A no gene *cyt b* foram 42 vezes mais resistentes à piraclostrobina. Esses altos níveis de resistência à fungicidas IQo podem ser o resultado de elevada pressão de seleção exercida pelos anos consecutivos de aplicações de estrobilurinas para o manejo de doenças do trigo no Brasil.

Palavras-chave: estrobilurina, citocromo b, inibidores de quinona oxidase, EC₅₀, *Triticum aestivum*.

ABSTRACT

Oliveira, S.C.; Castroagudín, V.L.; Maciel, J.L.N.; Pereira, D.A.S.; Ceresini, P.C. Cross-resistance to QoI fungicides azoxystrobin and pyraclostrobin in the wheat blast pathogen *Pyricularia oryzae* in Brazil. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.4, p.298-304, 2015.

Strobilurins are among the fungicides that are most commonly used in the control of wheat diseases, separately or in mixtures with fungicides that inhibit the enzyme succinate dehydrogenase (SDH). Strobilurins are known as quinone oxidoreductase inhibitors or QoI fungicides. As in fungal cells they have one single site of action as target, the mitochondrial *cyt b* gene, the continued use of strobilurins may represent a high risk of emergence of resistance to these fungicides for plant pathogens populations. This study aimed to test the hypothesis that resistance to azoxystrobin in the wheat blast fungus *Pyricularia oryzae* resulted in cross-resistance to pyraclostrobin, another QoI fungicide. To test this hypothesis, we compared the level of pyraclostrobin resistance presented by two groups of *P. oryzae* isolates from wheat: a) sensitive to azoxystrobin

and carrier of the non-mutant *cyt b* gene (haplotype H9), and b) resistant to azoxystrobin and carrier of the G143A mutation in the *cyt b* gene (H1 haplotype). Fungicides belonging to the same chemical group show cross-resistance. All *P. oryzae* isolates sensitive to azoxystrobin were also sensitive to pyraclostrobin. Isolates that were resistant to azoxystrobin were also resistant to pyraclostrobin, indicating cross-resistance to both fungicides. Two phenotypic groups were distinguished among the resistant isolates: (A) highly resistant and (B) resistant. *P. oryzae* isolates with the presence of G143A mutation in the *cyt b* gene were 42 times more resistant to pyraclostrobin. These high levels of resistance to QoI fungicides may be the result of high selection pressure exerted by consecutive years of strobilurin application for the management of wheat diseases in Brazil.

Additional keywords: strobilurin, cytochrome b, quinone oxidoreductase inhibitors, EC₅₀, *Triticum aestivum*.

Pyricularia oryzae Cavara tem distribuição mundial, sendo considerado um dos patógenos mais destrutivos do arroz. Mais de 50 gramíneas são atacadas por esse patógeno, embora a cultura do arroz seja considerada seu hospedeiro mais importante (22). No último século, esse fungo emergiu como patógeno importante adaptado ao trigo no sul do Brasil, causando a doença brusone (11).

Nos últimos 30 anos, devido à inexistência de cultivares de trigos resistentes a brusone e fungicidas eficazes para controlar o fungo (14, 17, 21, 23), o patógeno alcançou ampla distribuição espalhando-se rapidamente pela maioria das áreas produtoras de trigo no Brasil (1).

A busca por resistência à brusone tem sido intensa desde o primeiro relato da doença no final da década de 80, porém os resultados têm

sido considerados erráticos e inconsistentes (3, 8, 9, 16), pelo fato dos genótipos de trigo aparentemente resistentes se comportarem como suscetíveis em outras regiões do país (28). Maciel et al. (18) baseando-se na reação diferencial de um grupo de sete cultivares de trigo, analisaram uma população de 157 isolados do patógeno amostrada em 2005 e descreveram a ocorrência de oito grupos de virulência do patógeno (ou raças virulentas; 18), com distribuição distinta em diferentes regiões do Centro-Sul do Brasil. Essa descoberta possivelmente explica a variação do comportamento das cultivares de trigo cultivadas no país.

Sob o ponto de vista de manejo da brusone do trigo, a ineficácia de fungicidas é atribuída ao desconhecimento de aspectos importantes da biologia do patógeno, se a fonte de inóculo primário restringe-se às sementes, aos restos de cultura ou qual a importância de plantas invasoras como fonte de inóculo e às dificuldades de proteção da espiga, aparentemente o único órgão da planta sujeito à infecção (9, 14, 17, 21, 23, 28). Entre diversos grupos de fungicidas utilizados no controle das doenças do trigo, as estrobilurinas tem recebido destaque.

As estrobilurinas são compostos químicos extraídos, a princípio, do fungo *Strobilurus tenacellus* (Pers.) Singer, e amplamente usados como fungicidas na agricultura. Comercializadas desde o final do século XX, as estrobilurinas passaram a ser conhecidas como fungicidas inibidores de quinona oxidase ou fungicidas IQo, por terem como único modo bioquímico de ação a inibição da respiração mitocondrial, atuando no sítio Qo (24). A toxicidade das estrobilurinas é proveniente da inibição da cadeia respiratória ao nível do Complexo III, impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, interferindo na respiração do patógeno (6).

A interferência das estrobilurinas na respiração mitocondrial ocorre pelo bloqueio da transferência de elétrons no citocromo b (codificada pelo gene *cyt b*). Porque os fungicidas IQo foram amplamente utilizados no manejo doenças do trigo nos últimos 15 anos (17), deve ter havido forte pressão de seleção sobre populações de patógenos de trigo, incluindo *P. oryzae*, por mutações que conferem resistência a IQo. Na maioria dos patógenos, incluindo *P. oryzae*, a resistência à estrobilurina no *cyt b*, resulta em alteração de um aminoácido no códon 143 de glicina para alanina (G143A) (7).

Fungicidas pertencentes a um mesmo grupo químico apresentam resistência cruzada. Resistência cruzada ocorre quando populações de patógenos que desenvolvem resistência a um fungicida tornam-se, simultaneamente, resistentes a outros fungicidas que são afetados pela mesma mutação gênica e pelo mesmo mecanismo de resistência (5). Para as estrobilurinas, a resistência cruzada pode ocorrer para a azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina (6).

Dois mecanismos de resistência para o fungicida IQo tem sido relatado. O primeiro envolve mutação do gene citocromo b, resultando em alterações na sequência de nucleotídeos que impedem a ligação com o fungicida. Essa mutação resulta em resistência completa do patógeno ao fungicida. Um segundo mecanismo de resistência, porém menos comum, ocorre “*in vitro*” e foi identificado em vários fungos patogênicos, incluindo *P. oryzae*. Esse mecanismo envolve a atividade de uma enzima oxidase alternativa (OA), a qual oxida a ubiquinona, enquanto reduz oxigênio a água. Isso evita o bloqueio induzido pelos fungicidas IQo na cadeia de transporte de elétrons (13). Em *P. oryzae*, o gene OA é expresso “*in vitro*”, em resposta ao estresse oxidativo, contudo, a transcrição do gene OA é reprimida “*in planta*”, permitindo que fungicidas IQo sejam utilizados para controlar a doença causada por *P. oryzae* e outros fungos fitopatogênicos (13).

A resistência aos fungicidas à base de estrobilurina é, atualmente, considerada fenômeno comum, inclusive para *P. oryzae* (5). Nos Estados Unidos, desde o início do século XXI, já há relatos de

resistência a fungicidas IQo em populações de *P. oryzae* patogênico a *Lolium perenne* L. ou azevém (13). A resistência de fitopatógenos a fungicidas IQo tem sido observada na Europa e na Ásia em diversas culturas, incluindo, cevada, banana, videira e macieira (13).

A resistência a fungicidas IQo em populações do fungo *Mycosphaerella graminicola* do trigo foi recentemente relatada por Torriani et al. (27). A mutação G143A no gene citocromo bc1 causando resistência a fungicidas IQo foi detectada em todas as populações do fungo na Europa (Reino Unido, Dinamarca, Irlanda, França e Alemanha), indicando que a mutação para resistência a fungicidas IQo ocorre de forma recorrente e independente em genótipos distintos do patógeno e em regiões geográficas diferentes.

No Brasil, em 2014, o presente grupo de pesquisa constatou uma distribuição generalizada de resistência em populações de *P. oryzae* a fungicida IQo azoxistrobina, em cultura de trigo e de outros hospedeiros da família Poaceae por todo o Centro – Sul do Brasil. A frequência da mutação G143A, no gene *cyt b* para resistência à estrobilurinas, aumentou de 36% em 2005 para 90% em 2012. A presença da mutação G143A resultou em isolados de *P. oryzae* 200 vezes mais resistentes à azoxistrobina que os isolados selvagens sensíveis ao fungicida IQo. Essa descoberta indica necessidade urgente de reexaminar o uso de estrobilurinas para o manejo das doenças fúngicas do trigo no Brasil (2).

Este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que a resistência do fungo *P. oryzae* do trigo a azoxistrobina resultou em resistência cruzada a piraclostrobina, outro fungicida IQo. Para testar esta hipótese, foi comparado o nível de resistência à piraclostrobina apresentado por dois grupos de isolados do fungo *P. oryzae* do trigo: a) sensíveis à azoxistrobina e portadores do gene *cyt b* não mutante (haplotipo H9) e b) resistentes à azoxistrobina e portadores da mutação G143A no gene *cyt b* (haplotipo H1) (2).

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados

Para o estudo da resistência cruzada de populações de *P. oryzae* do trigo à piraclostrobina, foram utilizados 16 isolados provenientes de amostragens populacionais realizadas em lavouras de trigo em Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul no Brasil, no ano de 2012. Os isolados de *P. oryzae* foram previamente genotipados para o gene *cyt b* (Tabela 1) (2). O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da UNESP (Universidade Estadual Paulista), Campus de Ilha Solteira.

Resistência cruzada a piraclostrobina

O nível de resistência à piraclostrobina foi determinado com base na EC_{50} , concentração eficaz para causar 50% de inibição do crescimento micelial, dos isolados de *P. oryzae*. Os valores de EC_{50} foram determinados para dois grupos de isolados: a) oito isolados sensíveis à azoxistrobina – IQo-S (MO12.1.129, MO12.1.132, MO12.1.130, MO12.1.150, MO12.1.237, MO12.1.239, MO12.1.240 e MO12.1.280) e b) oito isolados resistentes – IQo-R (MO12.1.023, MO12.1.028, MO12.1.030, MO12.1.040, MO12.1.068, MO12.1.127, MO12.1.146 e MO12.1.096).

Para a produção de inóculo, os isolados foram cultivados em batata dextrose-ágar (BDA, Himedia) com adição de 50 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de estreptomicina e incubados a 25°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro por sete dias. O fungicida Comet® (piraclostrobina 250 g/L, BASF) foi diluído 1:1000 em água deionizada para produzir uma solução estoque. O

Tabela 1. Origem e caracterização genética e fenotípica dos isolados de *Pyricularia oryzae* do trigo quanto a resistência e sensibilidade aos fungicidas inibidores da quinona oxidase (IQo).

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

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

^b*cyt b-R* indicam haplotipos do gene *cyt b* resistentes a azoxistrobina e *cyt b-S* indicam haplotipos sensíveis (2).

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

meio de cultura BDA foi autoclavado e resfriado a 55°C e, em seguida, acrescido de 80 µg/mL de ácido salicilhidroxâmico (SHAM), necessário para suprimir a via alternativa da oxidase seguindo os procedimentos relatados por Ma et al. (15) com modificações e da suspensão estoque do fungicida piraclostrobina para atingir as concentrações finais de 0; 0,6250; 0,0195; 0,0098; 0,0049 e 0,0025 µg/mL de ingrediente ativo.

O inóculo constituiu-se de discos de 5 mm de diâmetro de micélio cortados da borda de colônias de sete dias de idade. Os discos de inóculo, com o lado coberto pelo micélio virado para baixo, foram transferidos para as placas de meio BDA com diferentes doses de piraclostrobina. Cada unidade experimental constituiu-se de uma placa de meio de cultura contendo quatro isolados distintos de *P. oryzae* e o procedimento repetido quatro vezes.

Foi medido o crescimento diametral, em centímetros, das colônias desenvolvidas a 25°C por cinco dias, subtraindo-se o diâmetro do disco micelial original (5mm). O crescimento micelial de *P. oryzae* nas diferentes doses testadas foi convertido em crescimento relativo (RG): 100 x (diâmetro médio da colônia em meio com fungicida) / (diâmetro médio da colônia em meio sem fungicida). As concentrações do fungicida foram transformadas em logaritmo natural. Para o cálculo dos valores de EC₅₀ de cada isolado, utilizou-se o programa ED50plus v1.0 (29). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, o experimento foi conduzido duas vezes e os dados foram analisados conjuntamente, uma vez que a magnitude dos erros experimentais foi semelhante confirmando a consistência das observações. A análise de variância e o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a comparação de médias de EC₅₀ de isolados foram efetuados utilizando-se o programa SISVAR (4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *P. oryzae* do trigo sensíveis à azoxistrobina (IQo-S) foram também sensíveis à piraclostrobina. Os valores de EC₅₀ de oito isolados sensíveis ao fungicida IQo azoxistrobina variaram de 0,0048 a 0,0132 µg/mL de i.a. do fungicida piraclostrobina, enquanto que os valores de EC₅₀ para os oito isolados resistentes a IQo – azoxistrobina variaram de 0,1587 a 0,5070 µg/mL de i.a. do fungicida. A maior EC₅₀ à piraclostrobina detectada para os isolados resistentes a IQo – azoxistrobina se aproximou da dose mais elevada testada, que foi de 0,6250 µg/mL (Tabela 2).

Por sua vez, não houve diferença significativa entre os isolados sensíveis (IQo-S) quanto à EC₅₀ para piraclostrobina (grupo C, pelo teste de Scott-Knott, Tabela 2). Os isolados resistentes a azoxistrobina (IQo-R) foram também resistentes à piraclostrobina (Figuras 1 e 2, Tabela 2), confirmando a hipótese inicial de resistência cruzada para os dois fungicidas. Entretanto, foi possível observar variação quantitativa da resistência a piraclostrobina. O teste Scott-Knott discriminou os isolados de *P. oryzae* resistentes a piraclostrobina em dois grupos fenotípicos diferentes: (A) altamente resistentes e (B) resistentes (Tabela 2). A média de valores de EC₅₀ para o grupo dos isolados sensíveis, que corresponde a oito isolados, foi de 0,0077 (± 0,0023) µg/mL de piraclostrobina. Para o grupo B de isolados resistentes (cinco isolados), a média de EC₅₀ foi de 0,2094 (± 0,0293) µg/mL de piraclostrobina. O grupo de isolados altamente resistentes (A), composto de três isolados, apresentou média de EC₅₀ de 0,5059 (± 0,0013) µg/mL de piraclostrobina.

A média da EC₅₀ para a combinação de todos os oito isolados resistentes foi de 0,3205 (± 0,1454) µg/mL de piraclostrobina. Portanto,

Tabela 2. Valores médios de EC_{50} à piraclostrobina detectados para isolados sensíveis (IQo-S) e para isolados resistentes (IQo-R) ao fungicida inibidor da quinona oxidase de *Pyricularia oryzae* do trigo.

| Isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> | Haplotipos <i>cyt B</i> ¹ | EC_{50} (µg/mL de piraclostrobina) ^{2,3} | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---|----------------|
| Isolados IQo-S | | | |
| MO 12.1.237 | H9 | 0,0068 | C ⁴ |
| MO 12.1.239 | H9 | 0,0059 | C |
| MO 12.1.240 | H9 | 0,0080 | C |
| MO 12.1.129 | H9 | 0,0072 | C |
| MO 12.1.130 | H9 | 0,0132 | C |
| MO 12.1.150 | H9 | 0,0085 | C |
| MO 12.1.132 | H9 | 0,0048 | C |
| MO 12.1.280 | H9 | 0,0074 | C |
| Média de isolados sensíveis | | 0,0077 | |
| Desvio padrão da média | | ± 0,0023 | |
| Isolados IQo-R | | | |
| MO 12.1.146 | H1 | 0,2217 | B |
| MO 12.1.030 | H1 | 0,2168 | B |
| MO 12.1.096 | H1 | 0,1587 | B |
| MO 12.1.023 | H1 | 0,2478 | B |
| MO 12.1.127 | H1 | 0,2019 | B |
| MO 12.1.028 | H1 | 0,5065 | A |
| MO 12.1.040 | H1 | 0,5070 | A |
| MO 12.1.068 | H1 | 0,5040 | A |
| Média de isolados resistentes | | 0,3205 | |
| Desvio padrão da média | | ± 0,1454 | |

¹Dados obtidos a partir da análise de sequências do gene *cyt b* (2).

²Média de oito repetições (combinação de dois experimentos independentes com quatro repetições cada).

³A análise de variância combinada das duas réplicas do experimento indicou $F_{isolados} = 13,94$ ($P \leq 0,01$).

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

a presença da mutação G143A no gene *cyt b* possibilitou, em média, que os isolados de *P. oryzae* fossem 42 vezes mais resistentes à piraclostrobina. Para efeito de comparação com outro fungicida IQo, a EC_{50} média para azoxistrobina detectada em isolados IQo-R de *P. oryzae* foi 200 vezes maior que em isolados IQo-S (2). Apesar da diferença em magnitude entre a resistência de *P. oryzae* à piraclostrobina e à azoxistrobina, cerca de cinco vezes menor, os níveis de resistência observados são consideravelmente altos. Esse fato pode ser o resultado de elevada pressão de seleção exercida pelos anos consecutivos de aplicações de estrobilurinas para o manejo de doenças do trigo no Brasil, que está em curso a, pelo menos, 15 anos (17, 18).

Casos de resistência cruzada entre fungicidas estrobilurinas foram verificados para vários patossistemas em que a resistência havia sido detectada. Em isolados de campo de *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet, causando a Sigatoka negra da banana, a resistência cruzada

foi observada entre todos os inibidores da Q_o , incluindo trifloxistrobina, azoxistrobina, famoxadona, estrobilurinas B e myxothiazol (25). Em *Microdochium nivale* e *M. majus*, que atacam cereais, foi observada resistência cruzada positiva entre todas as estrobilurinas testadas: azoxistrobina, trifloxistrobina, crezoximetila, picoxistrobina e famoxadona (30). Em áreas de pepino no Japão, Ishii et al. (12) verificaram resistência cruzada entre azoxistrobina e crezoximetila para oídio [*Podosphaera fusca* (Fr.) U Braun & N Shishkoff] e mildio [*Pseudoperonospora cubensis* (Berkeley & M. A. Curtis) Rostovzev].

Apesar do alto risco de resistência atribuído aos fungicidas IQo (5), argumentos, certamente questionáveis, indicavam dificuldade em prever o período de tempo para o desenvolvimento de resistência a estrobilurinas, pois este dependeria de inúmeros fatores associados à complexidade de cada patossistema em particular. Os seguintes fatores foram citados: a) a capacidade inerente das populações de fungos

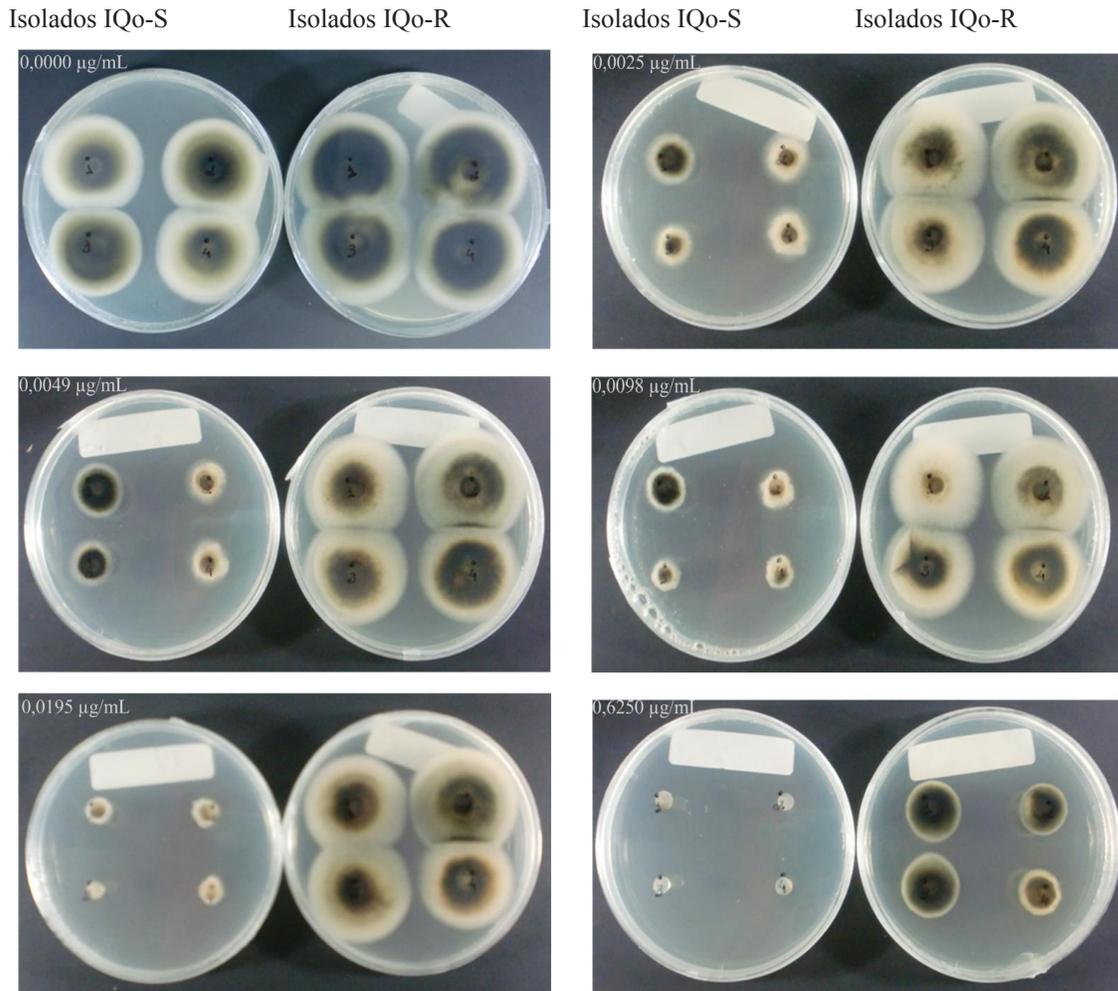
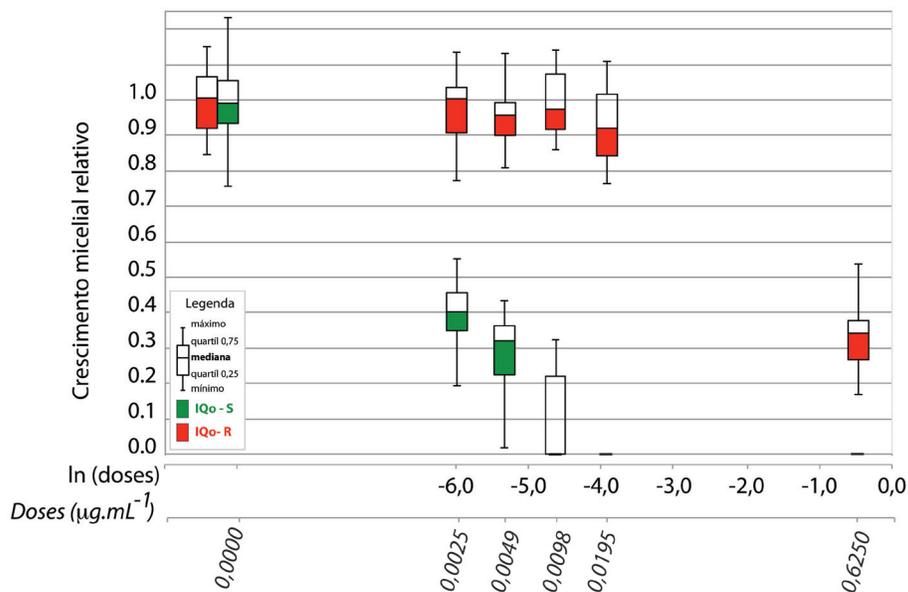


Figura 1. Sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Pyricularia oryzae* do trigo sensíveis (IQo-S) e resistentes (IQo-R) ao fungicida inibidor da quinona oxidase (IQo) piraclostrobina, nas concentrações 0; 0,0025; 0,0049; 0,0098; 0,0195 e 0,06250 µg/mL com 80 µg/mL de ácido salicilhidroxâmico.



*ln (doses) – Doses transformadas em logaritmo.

Figura 2. Crescimento micelial relativo médio de oito isolados sensíveis (IQo-S) e de oito isolados resistentes (IQo-R) de *Pyricularia oryzae* do trigo, ao fungicida inibidor da quinona oxidase (IQo) em diferentes doses do fungicida piraclostrobina, nas concentrações de 0; 0,0025; 0,0049; 0,0098; 0,0195 e 0,6250 µg/mL com 80 µg/mL de ácido salicilhidroxâmico. Média de oito repetições (combinação de dois experimentos independentes com quatro repetições cada).

fitopatogênicos em desenvolver resistência (variabilidade genética); b) a biologia do patógeno (especialmente sua taxa de reprodução); c) a magnitude da pressão de seleção (diretamente relacionada ao número de aplicações de fungicidas na cultura); d) a frequência da adoção de estratégias anti-resistência a fungicidas, como o uso de misturas e alternâncias de fungicidas em relação ao uso de princípios ativos isoladamente; e) a qualidade da cobertura da cultura na aplicação do fungicida e f) a velocidade de degradação do fungicida, que é dependente das variações climáticas locais (15). Entretanto, apesar da imprevisibilidade alegada, foram inúmeros os relatos de resistência às estrobilurinas na última década (13). Em situações extremas, por exemplo, para o oídio do trigo, constatou-se desenvolvimento de resistência dentro de dois anos de uso comercial (26). No caso específico de *P. oryzae* do trigo, os presentes resultados indicaram que já em 2005, alguns anos após a introdução de estrobilurinas no mercado brasileiro, 36% da população do patógeno apresentava resistência a azoxistrobina, e que em 2012, sete anos após, este percentual saltou para 90% da população do patógeno amostrada (2).

Evidências indicam a necessidade urgente de reavaliar o uso de estrobilurinas para o manejo da brusone, bem como de outras principais doenças do trigo no Brasil, pois, provavelmente, a resistência aos fungicidas IQo é o principal fator atribuído à baixa eficácia desses fungicidas (14, 17, 21, 23). De forma surpreendente, não há no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) registro específico de estrobilurinas para o manejo do patógeno da brusone (*P. oryzae*) embora haja registro para os demais patógenos foliares do trigo (19).

Sob o ponto de vista do manejo da resistência a fungicidas, Mikaberidze et al. (20) propuseram que o custo adaptativo da resistência à fungicidas para as populações de fitopatógenos é um parâmetro crucial para determinar o resultado da competição entre as estirpes sensíveis e resistentes do patógeno e para avaliar a utilidade da mistura de fungicidas. Se não houver custo adaptativo, mesmo a utilização do fungicida de alto risco em mistura pode selecionar o fitopatógeno para resistência e, eventualmente, o fungicida de alto risco se torna não funcional. Se existir um custo adaptativo para a resistência, uma proporção ideal do fungicida na mistura pode ser utilizada, onde se espera que a seleção para as linhagens resistentes desapareçam e o nível de controle da doença seja otimizado.

A ação mais adequada para o manejo dos elevados níveis de resistência a fungicidas IQo e da resistência cruzada detectada, seria a remoção da pressão de seleção sobre as populações do patógeno da brusone do trigo (7). No caso de um elevado custo adaptativo associado com a aquisição de resistência IQo, com a remoção da pressão da seleção de fungicidas IQo, previa-se que as populações de *P. oryzae* poderiam retornar aos seus níveis originais de sensibilidade ao fungicida (10). Entretanto, as mutações para resistência relatadas para *P. oryzae* que infecta outras poáceas foram consideradas estáveis e sem custo adaptativo para o patógeno, indicando um cenário irreversível (13).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por auxílio à pesquisa concedido pela FAPESP (Fundação de Pesquisa São Paulo, Brasil) a P.C. Ceresini (2013/10655-4), por auxílio à pesquisa concedido pela EMBRAPA/Monsanto (Macroprograma II) a J.L.N. Maciel, por bolsas de pesquisa (Pq-2 308394/2009-7 e 307361/2012-8) e auxílios (504073/2011-7 e 454543/2013-1) concedidos pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) a P.C. Ceresini. Apoio a S.C. de Oliveira com uma bolsa de mestrado da FAPESP (2013/03116-0) e a V.L. Castroagudin com uma bolsa de pós-doutorado do CNPq (PDJ 150490/2013-5).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anjos, J.R.N.D.; Silva, D.B.; Charchar, M.J.D.; Rodrigues, G.C. Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos cerrados do Brasil Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.1, p.79-82, 1996.
- Castroagudin, V.L.; Ceresini, P.C.; Oliveira, S.C.; Reges, J.T.A.; Maciel, J.L.N.; Bonato, A.L.V.; Dorigan, A.F.; McDonald, B.A. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.105, n.3, p.284-294, 2015. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-06-14-0184-R>>. Acesso em: 08 out. 2014.
- Cruz, M.F.; Prestes, A.M.; Maciel, J.L.N.; Scheeren, P.L. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, n.1, p.24-31, 2010.
- Ferreira, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agro-tecnologia (UFLA)**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- Fungicide resistance action committee (FRAC). In: **List of pathogens with field resistance towards IQo fungicides (updated 12/09/12)**. Disponível em: <<http://www.frac.info>>. Acesso em: 29 jan. 2013.
- Ghini, R.; Kimati, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.
- Gisi, U.; Sierotzki, H.; Cook, A.; Mccaffery, A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v.58, p.859-867, 2002.
- Goulart, A.C.P.; Paiva, F.A. Incidência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p.321-325, 1992.
- Goulart, A.C.P.; Paiva, F.A.; Andrade, P.J.M. Relação entre a incidência da brusone em espigas de trigo e a presença de *Pyricularia grisea* nas sementes colhidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p.184-189, 1995.
- Hobbelen, P.H.; Paveley, N.D.; Van Den Bosch, F. The emergence of resistance to fungicides. **PLoS One**, San Francisco, v.9, p.1-14, 2014. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0091910>>. Acesso em: 19 set. 2014.
- Igarashi, S.; Utiyama, C.M.; Igarashi, L.C.; Kazuma, A.H.; Lopes, R.S. *Pyricularia* em trigo. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, n.2, p.351-352, 1986.
- Ishii, H.; Fraaije, B.A.; Sugiyama, T.; Noguchi, K.; Nishimura, K.; Takeda, T.; Amano, T.; Hollomon, D.W. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, n.12, p.1166-1171, 2001.
- Kim, Y.S.; Dixon, E.W.; Vincelli, P.; Farman, M.L. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, n.7, p.891-900, 2003.
- Kohli, M.M.; Mehta, Y.R.; Guzman, E.; Viedma, L.; Cubilla, L.E. *Pyricularia* blast - a threat to wheat cultivation. **Czech J. Genet. Plant Breed.**, Praga, v.47, p.S130-S134, 2011.
- Ma, B.; Uddin, W.; Olaya, G. Baseline and non-baseline sensitivity of *Magnaporthe oryzae* isolates from perennial ryegrass to azoxystrobin in the northeastern United States. **Can. J. Plant Pathol.**, Abingdon, v.31, p.57-64, 2009.
- Maciel, J.L.N.; Paludo, E.A.; Só e Silva, M.; Scheeren, P.L.; Caierão, E. Reação à brusone de genótipos de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo no estádio de planta adulta. **Embrapa Trigo: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online**, Passo Fundo, n.64, p.1-14, 2008. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp64.pdf>. Acesso em: 19 set. 2014.
- Maciel, J. L. N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **CABI Reviews - Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Oxfordshire, v.6, n.50, p.1-8, 2011.
- Maciel, J.L.N.; Ceresini, P.C.; Castroagudin, V.L.; Zala, M.; Kema, G.H.J.; McDonald, B.A. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v.104, n.1, p.95-107, 2014. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO-11-12-0294-R>>. Acesso em: 08 out. 2014.

19. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwsvlet?agrofit_cons&pragas.rdf&p_script_body=&p_id_cultura_praga=5372¶mform=no>. Acesso em: 08 out. 2014.
20. Mikaberidze, A.; Mcdonald, B.A.; Bonhoeffer, S. Can high-risk fungicides be used in mixtures without selecting for fungicide resistance? **Phytopathology**, St.Paul, v.104, n. 4, p.327-331, 2013.
21. Navarini, L.; Balardin, R.S. Doenças foliares e o controle por fungicidas na produtividade e qualidade de grãos de trigo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n. 4, p.294-299, 2012.
22. Ou, S.H. Blast. In: Ou, S.H. **Rice diseases**. 2ed. Wallingford UK: CAB International, 1985. p.109-201.
23. Pagani, A.P.S.; Dianese, A.C.; Café-Filho, A.C. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12600-014-0401-x>>. Acesso em: 08 out. 2014.
24. Parreira, D.F.; Neves, W.S.; Zambolim, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luís, v.3, n.2, p.24-34, 2009.
25. Sierotzki, H.; Parisi, S.; Steinfeld, U.; Tenzer, I.; Poirey, S.; Gisi, U. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc₁ enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. **Pest Management Science**, West Sussex, v.56, p.833-84, 2000.
26. Sierotzki, H.; Wullschlegel, J.; Gisi, U. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp *tritici* field isolates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.68, p.107-112, 2000.
27. Torriani, S.F.F.; Brunner, P.C.; Mcdonald, B.A.; Sierotzki, H. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, West Sussex, n.65, p.155-162, 2008.
28. Urashima, A. S.; Lavorent, N.A.; Goulart, A.C.P.; Mehta, Y.R.. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.511-518, 2004.
29. Vargas, M.H. ED50plus v1.0. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico DF, Mexico, 2000.
30. Walker, A.S.; Auclair, C.; Gredt, M.; Leroux, P. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains. **Pest Management Science**, West Sussex, v.65, p.906-915, 2009.