

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

***Magnaporthe oryzae*: VARIABILIDADE**
GENÉTICA E CONTROLE QUÍMICO

CRISTINA BOARETTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção e Proteção de Plantas.

Passo Fundo, março de 2016

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

***Magnaporthe oryzae*: VARIABILIDADE
GENÉTICA E CONTROLE QUÍMICO**

CRISTINA BOARETTO

Orientador: Prof. Dr. Walter Boller

Coorientador: Pesquisador, Dr. João Leodato Nunes Maciel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção e Proteção de Plantas.

Passo Fundo, março de 2016

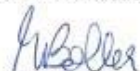
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

"Magnaporthe oryzae: VARIABILIDADE GENÉTICA E CONTROLE QUÍMICO"

Elaborada por
Cristina Boaretto

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

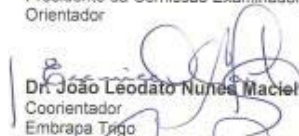
Aprovada em: 28/03/2016
Pela Comissão Examinadora



Dr. Walter Boller
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador



Dra. Eunice Oliveira Calvete
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia



Dr. João Leodato Nunes Maciel
Coorientador
Embrapa Trigo



Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV



Dr. José Maurício Cunha Fernandes
Embrapa Trigo



Dra. Ana Lidia Bonato
Embrapa Trigo



Dr. Carlos Alberto Forcelini
FAMV/UPF

CIP – Catalogação na Publicação

B662m Boaretto, Cristina

Magnaporthe oryzae : variabilidade genética e controle químico / Cristina Boaretto. – 2016.
176 f. : il. ; 25 cm.

Orientador: Prof. Dr. Walter Boller.

Coorientador: Pesquisador, Dr. João Leodato Nunes Maciel.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) –
Universidade de Passo Fundo, 2016.

1. Trigo – Doenças e pragas. 2. Trigo –
Melhoramento genético. 3. Plantas – Efeito dos
fungicidas. 4. Brusone. 5. Pragas – Controle. I.
Boller, Walter, orientador. II. Maciel, João Leodato
Nunes, coorientador. III. Título.

CDU: 633.11

Catalogação: Bibliotecária Schirlei T. da Silva Vaz – CRB 10/1364

BIOGRAFIA DO AUTOR

Cristina Boaretto nasceu em 12 de novembro de 1982 no município de Sananduva, Rio Grande do Sul. Possui graduação em Fisioterapia pela Universidade Paranaense (2004), e em Agronomia pela Universidade de Passo Fundo (2013). Em 2014, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia, na Universidade de Passo Fundo, RS. Durante os cinco anos da graduação foi bolsista de iniciação científica, se dedicando à pesquisa na área de fitopatologia, desenvolvendo trabalhos em patologia de sementes e experimentos visando o controle de doenças na soja, e no trigo. Os dois anos de mestrado foram dedicados exclusivamente ao patossistema *Triticum aestivum*-*Magnaporthe oryzae*, com estudos de variabilidade genética do patógeno e controle químico da brusone em trigo.

*Dedico aos meus amores,
Anderson, Joaquim e Miucha, por mil razões.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar possível tudo que se crê.

Aos meus familiares, pela paciência e compreensão.

Ao professor Dr. Walter Boller, pela orientação, dedicação e comprometimento.

Ao Dr. João Leodato Nunes Maciel, pela coorientação e oportunidades.

À CAPES, à UPF e ao PPGAgro, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do PPGAgro, pelos ensinamentos e conselhos de vida.

À Embrapa Trigo, pela infraestrutura e por possibilitar a realização do projeto.

Aos funcionários e estagiários da Embrapa Trigo e da Universidade de Passo Fundo, e aos colegas Anderson L. D. Danelli, Bianca de Moura Barber, Carlos A. Pizzoloto, e Jéssica R. Ferreira, por oferecerem uma mão amiga.

Aos membros da banca, Dr^a. Ana Lúcia Varianni Bonato, Dr. Carlos Alberto Forcelini e Dr. José Maurício Fernandes, pela avaliação do trabalho e contribuições.

Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Ocorrência da brusone do trigo.....	9
2.2 Ciclo da doença.....	11
2.3 Variabilidade genética de <i>Magnaporthe oryzae</i>	13
2.4 Reprodução sexual.....	14
2.5 Parassexualidade.....	16
2.6 Mutações.....	17
2.7 Marcadores moleculares e a variabilidade genética de <i>Magnaporthe oryzae</i>	18
2.8 Controle químico da brusone do trigo.....	20
2.9 Sensibilidade e fungitoxicidade.....	22
2.10 Tecnologia de aplicação de fungicidas.....	24
CAPÍTULO I	29
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Coleção dos isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i>	35
2.2 Isolados referência de <i>Magnaporthe oryzae</i>	39
2.3 Identificação dos idiomorfos, da sexualidade, da fertilidade e da presença de órgãos sexuais de isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i>	39
2.4 Inoculação de isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> em plântulas de trigo.....	41
2.5 Reisolamentos das lesões de <i>Magnaporthe oryzae</i>	43
2.6 Extração e quantificação do DNA de isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i>	45
2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e marcadores microssatélites (SSR).....	47
2.8 Eletroforese capilar.....	49
2.9 Análise estatística.....	50
2.10 Fluxograma do trabalho.....	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

	Página
3.1 Identificação e caracterização sexual de idiomorfos de <i>Magnaporthe oryzae</i>	51
3.2 Variabilidade genética de isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> do trigo e de outros hospedeiros.....	62
3.3 Variabilidade genética em reisolados de infecções conjuntas de isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> e de poáceas invasoras com idiomorfos compatíveis.....	66
4 CONCLUSÕES	80
CAPÍTULO II	82
RESUMO	82
ABSTRACT	83
1 INTRODUÇÃO	84
2 MATERIAL E MÉTODOS	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4 CONCLUSÕES	101
CAPÍTULO III	102
RESUMO	102
ABSTRACT	103
1 INTRODUÇÃO	104
2 MATERIAL E MÉTODOS	108
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
4 CONCLUSÕES	124
CAPÍTULO IV	126
RESUMO	126
ABSTRACT	127
1 INTRODUÇÃO	128
2 MATERIAL E MÉTODOS	131
2.1 Cultivo das plantas.....	131
2.2 Isolado de <i>Magnaporthe oryzae</i> e inoculação.....	132
2.3 Pontas de pulverização e aplicação do fungicida.....	133
2.4 Avaliação das espigas sintomáticas, do espectro de pulverização e análise dos dados.....	135
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
4 CONCLUSÕES	148
REFERÊNCIAS	149

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – *Magnaporthe oryzae*: identificação e caracterização de idiomorfos e análise da variabilidade genética

Tabela		Página
1	Origem geográfica, hospedeiro e identificação dos isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> e <i>Magnaporthe grisea</i> Passo Fundo-RS, 2016.....	36
2	Conjunto de isolados parentais de <i>Magnaporthe oryzae</i> de acordo com a compatibilidade sexual, e a identificação dos isolados recuperados. Passo Fundo-RS, 2016...	45
3	Características dos 24 dos marcadores SSR para os isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> . Passo Fundo-RS, 2016.....	48
4	Reagentes e concentrações para a técnica de PCR. Passo Fundo-RS, 2016.....	49
5	Identificação dos conjuntos inoculados (hospedeiros do patógeno), e a porcentagem de reisolados variantes de <i>Magnaporthe oryzae</i> . Passo Fundo-RS, 2016.....	68

CAPÍTULO II – Sensibilidade “*in vitro*” de *Magnaporthe oryzae* do trigo a fungicidas inibidores do crescimento miceliano

Tabela		Página
1	Identificação e origem dos isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> . Passo Fundo-RS, 2016.....	88
2	Ingredientes ativos utilizados para determinar a sensibilidade miceliana, <i>in vitro</i> , de 20 isolados <i>Magnaporthe oryzae</i> . Passo Fundo-RS, 2016.....	90
3	Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano e sensibilidade de <i>Magnaporthe oryzae</i> do trigo a fungicidas. Passo Fundo-RS, 2016.....	97
4	Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano e sensibilidade de <i>Magnaporthe oryzae</i> do trigo a fungicidas. Passo Fundo-RS,	

2016.....	99
-----------	----

CAPÍTULO III – Sensibilidade “*in vitro*” de *Magnaporthe oryzae* do trigo a fungicidas inibidores da germinação de conídios

Tabela		Página
1	Identificação e origem dos isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> . Passo Fundo-RS, 2016....	109
2	Ingredientes ativos utilizados para determinar a sensibilidade de conídios, <i>in vitro</i> , de 20 isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> . Passo Fundo-RS, 2016.....	110
3	Concentração inibitória de 50% da germinação de conídios e sensibilidade de <i>Magnaporthe oryzae</i> do trigo a fungicidas. Passo Fundo-RS, 2016.....	117
4	Concentração inibitória de 50% da germinação de conídios e sensibilidade de <i>Magnaporthe oryzae</i> do trigo a fungicidas. Passo Fundo-RS, 2016.....	120

CAPÍTULO IV – Deposição de calda em espigas artificiais por três pontas de pulverização em aplicação de fungicida para o controle da brusone do trigo

Tabela		Página
1	Características das pontas de pulverização e parâmetros da pulverização comparados. Passo Fundo-RS, 2016.....	133

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – *Magnaporthe oryzae*: identificação e caracterização de idiomorfos e análise da variabilidade genética

Figura		Página
1	Pareamento dos isolados pelo método de repicagem dos três pontos (A), isolado referência KA 3 (1), isolado referência GUY 11 (2), isolado teste (3); peritécios/cm ² (B). Passo Fundo-RS, 2016.....	41
2	Plântulas de trigo inoculadas com diferentes combinações de isolados. Dois copos para cada combinação de isolado (A), 20 combinações de isolados (B). Passo Fundo-RS, 2016.....	43
3	Idiomorfos de <i>Magnaporthe oryzae</i> em quatro estados brasileiros. Passo Fundo-RS, 2016.....	55
4	Idiomorfos de <i>Magnaporthe oryzae</i> em três estados brasileiros. Passo Fundo-RS, 2016.....	56
5	Estruturas reprodutivas sexuada de <i>Magnaporthe oryzae</i> . Peritécio recém-formado (A) e maduro (B); Asca com ascósporos (C); Ascósporos tri-septados (D). Passo Fundo-RS, 2016.....	58
6	Dendrograma dos 20 isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> e 2 isolados de <i>Magnaporthe grisea</i> . Passo Fundo-RS, 2016.....	64
7	Dendrograma de dois conjuntos inoculados. (1 e 2) Isolados parentais obtidos de <i>Digitaria sanguinalis</i> ; (3) Isolado parental obtido de <i>Triticum aestivum</i> com os reisolados do conjunto A e do F. Passo Fundo-RS, 2016.....	71
8	Dendrograma de 0 % de reisolados variantes. (1) Isolados parentais obtido de <i>Eragrotis plana</i> e <i>Digitaria sanguinalis</i> ; (2) Isolado parental obtidos de <i>Cenchrus echinatus</i> ; (3) Isolado parental obtido de <i>Digitaria sanguinalis</i> ; (4) Isolados parentais obtidos de <i>Cynodon spp.</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Chloris spp.</i> ;	

Figura	Página	
9	<p>(5) Dois isolados parentais obtidos de <i>Triticum aestivum</i>, e reisolados do conjunto A,B, C, D, E, F, e L. Passo Fundo-RS, 2016.....</p> <p>Dendrograma de 10% de reisolados variantes. (1) Isolado parental obtido de <i>Panicum maximum</i>; (2) Isolado parental obtido de <i>Brachiaria spp.</i>; (3) Reisolados variantes I, J, Q, e O, dos conjuntos inoculados; (4) Isolados parentais obtidos de <i>Triticum aestivum</i>, <i>Eleusine indica</i>, <i>Lolium multiflorum</i>, <i>Cyperus rotundus</i> e reisolados não variantes dos conjuntos H, I, J, O e Q. Passo Fundo-RS, 2016.....</p>	73
10	<p>Dendrograma de 25% de reisolados variantes. (A) 1-Isolado parental obtido de <i>Elionurus candidus</i>; 2-Reisolados G variantes; 3-Isolado parental obtido de <i>Triticum aestivum</i> e reisolados G não variantes. (B) 1 e 2-Reisolados N variantes; 3-Isolado parental obtido de <i>Triticum aestivum</i>, de <i>Cenchrus echinatus</i>, e reisolados N não variantes. (C) 1-Isolado parental obtido de <i>Triticum aestivum</i>; 2-Reisolados P variantes; 3-Isolado parental obtido de <i>Avena sativa</i> e reisolados P não variantes. Passo Fundo-RS, 2016.....</p>	75
11	<p>Dendrograma de $\geq 50\%$ de reisolados variantes. (A) 1-Isolado parental obtido de <i>Triticum aestivum</i>; 2-Isolado parental obtido de <i>Echinochloa spp.</i>; 3-Isolado parental obtido de <i>Sorghum sudanense</i> e reisolados K não variantes; 4-Reisolados K e S variantes. (B) 1-Isolados parentais obtidos de <i>Triticum aestivum</i>, <i>Brachiaria spp.</i>, <i>Rhynchelytrum repens</i>; 2-Isolado parental obtido de <i>Chloris spp.</i> e reisolados não variantes; 3, 4 e 5-Reisolados M, R e T variantes. Passo Fundo-RS, 2016.....</p>	76
		77

CAPÍTULO IV – Deposição de calda em espigas artificiais por três pontas de pulverização em aplicação de fungicida para o controle da brusone do trigo

Figura	Página
1 Cartão hidrossensível posicionado de forma a simular a morfologia de uma espiga de trigo. Passo Fundo-RS, 2016.....	135
2 Distribuição volumétrica das gotas por classes de tamanho, por diferentes pontas. Passo Fundo – RS, 2016.....	138
3 Gotas com diâmetro inferior a 100 e 200 μm pulverizada por diferentes pontas. Passo Fundo – RS, 2016.....	139
4 Diâmetro mediano volumétrico versus número de impactos cm^{-2} , por diferentes pontas de pulverização. Passo Fundo – RS, 2016.....	140
5 Perfis de cobertura pelas diferentes pontas versus a severidade da doença. Passo Fundo – RS, 2016.....	142
6 Recuperação da calda pulverizada por três pontas de pulverização. Passo Fundo – RS, 2016.....	145
7 Homogeneidade e uniformidade do espectro de gotas pulverizadas por diferentes pontas. Passo Fundo – RS, 2016	146
8 Deposição do fungicida obtida em cartões hidrossensíveis posicionados verticalmente no dossel da cultura do trigo, por diferentes pontas de pulverização e diferentes volumes de aplicação. Passo Fundo – RS, 2016.....	147

***Magnaporthe oryzae*: VARIABILIDADE GENÉTICA E CONTROLE QUÍMICO**

CRISTINA BOARETTO¹

RESUMO – Dentre os fatores responsáveis pela ineficiência das estratégias de controle da brusone do trigo, está a alta variabilidade do fungo *Magnaporthe oryzae* B. Couch (anamorfo *Pyricularia oryzae* Cavara). Para o estudo da variabilidade genética de *M. oryzae* do trigo e de plantas invasoras, foi realizado a identificação dos idiomorfos e da sexualidade do patógeno *in vitro* com o auxílio de isolados testadores, e para a identificação dos variantes *in vivo*, foram realizadas inoculações e genotipagem do patógeno. Na população estudada, prevaleceu o idiomorfo MAT1-1, com presença de órgãos sexuais completos, e hermafroditismo entre os isolados de plantas invasoras. A ocorrência de variantes do patógeno *in vivo*, identificou que as plantas invasoras são além de hospedeiros alternativos do patógeno, fontes geradoras de variabilidade. Quanto ao manejo químico para o controle da brusone do trigo, avaliou-se *in vitro* a sensibilidade do crescimento miceliano e da germinação de conídios de isolados de *M. oryzae* ao antibiótico casugamicina, aos fungicidas carbendazim, triciclazol, tebuconazol, protioconazol,

¹ Eng^a. Agr^a., mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, bolsista CAPES/Embrapa, Projeto “*Magnaporthe oryzae*: O desafio da tropicalização do trigo no Brasil.”

mancozebe, azoxistrobina, trifloxistrobina, à mistura comercial protioconazol+trifloxistrobina, piraclostrobina+ fluxapiróxade, ao ácido salicílic-hidroxâmico (SHAM), e à mistura SHAM+azoxistrobina. Os fungicidas foram solubilizados em meio BDA, nas concentrações de 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 100,00 mg L⁻¹. A fungitoxicidade dos produtos foi determinada por meio da CI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento miceliano ou 50% da germinação dos conídios), e a sensibilidade dos isolados classificada em alta, moderada, baixa e insensível. Para o crescimento miceliano, os isolados em sua maioria foram insensíveis ao antibiótico casugamicina, e altamente sensíveis aos demais fungicidas estudados. Para a germinação de conídios, os fungicidas mancozebe e a mistura de piraclostrobina+fluxopiróxade apresentaram a maior fungitoxicidade. Dezenove isolados apresentaram insensibilidade a azoxistrobina, e SHAM apresentou potencial fungitóxico para *M. oryzae*. A eficiência da deposição de fungicida na espiga do trigo, para o controle da brusone, foi avaliada para três pontas de pulverização com três volumes de calda diferentes. As pontas utilizadas foram, jato cônico vazio (JA 1 – 100 L ha⁻¹), jato plano duplo (DB 110015 – 150 L ha⁻¹) e jato plano duplo (TJ60 11002 – 200 L ha⁻¹), e o fungicida pulverizado foi a mistura comercial protioconazol+trifloxistrobina+ óleo vegetal Áureo[®]. Utilizaram-se cartões hidrossensíveis para capturar o espectro de pulverização, que foram escaneados após a passagem do pulverizador com a calda, e avaliou-se também, a severidade da doença em espigas sintomáticas. A ponta de jato cônico vazio mostrou uma

uniformidade de distribuição da calda com a produção de gotas muito finas, no entanto não foi tão eficiente quanto às pontas de jatos planos para o controle da doença. As pontas DB 110015 e TJ60 11002 produziram gotas finas e foram similares para os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: *Pyricularia oryzae*, *Triticum aestivum*, diversidade, fungicidas.

***Magnaporthe oryzae*: GENETIC VARIABILITY AND CHEMICAL CONTROL**

ABSTRACT - Among the factors responsible for the inefficiency of the wheat blast control strategies is the high variability of the fungus *Magnaporthe oryzae* B. Couch (anamorph *Pyricularia oryzae* Cavara). To characterize the genetic variability of *M. oryzae* on wheat and weeds, it was conducted the identification the idiomorphs and sexuality of the pathogen *in vitro* with the help of testers, and *in vivo* variants, with the help of inoculations and genotyping. In the studied population the MAT1-1 idiomorph prevailed with the presence of complete sexual organs, and hermaphroditism among isolates of invasive plants. The occurrence of *in vivo* pathogen variants identified that the weeds are not just alternative hosts of the pathogen, but also the sources of variability. Regarding the chemical management for the control of wheat blast, it was evaluated *in vitro* the sensitivity of the mycelial growth and spore germination of *M. oryzae* isolates the antibiotic

kasugamycin, to carbendazim fungicide, tricyclazole, tebuconazole, prothioconazole, mancozeb, azoxystrobin, trifloxystrobin, commercial mixture prothioconazole+trifloxystrobin, pyraclostrobin+ fluxapyroxad, the salicylhydroxamic acid (SHAM), the mixture SHAM+azoxystrobin. The fungicides were solubilized in PDA medium at concentrations of 0.00; 0.01; 0.10; 1.00; 10.00 and 100.00 mg L⁻¹. The toxicity of the products was determined by means of EC₅₀ (concentration necessary to inhibit 50% of the mycelium growth to 50% of the conidia germination) and sensitivity of the isolates classified into high, moderate, low and insensitive. For mycelium growth, isolates were mostly insensitive to the antibiotic kasugamycin, and highly sensitive to the other fungicides studied. For the germination of conidia, fungicides mancozeb and the mixture of pyraclostrobin + fluxopiroxade showed the highest fungitoxicity. Nineteen isolates showed insensitivity to azoxystrobin and SHAM showed fungitoxic potential for *M. oryzae*. The fungicidal deposition efficiency in wheat spike, for the control of rice blast, was evaluated for three spray nozzles with three volumes of spray. The nozzles used were hollow cone (JA 1-100 L ha⁻¹), jet double plan (DB 110015-150 L ha⁻¹) and jet twin flat (TJ60 11002-200 L ha⁻¹) and the fungicide sprayed was the commercial mixture prothioconazole+trifloxystrobin+ vegetable oil *Áureo*®. Water sensitive cards were used to capture the spray spectrum were scanned after the passage of the nozzle with the syrup, and, and it also evaluated the severity of symptomatic disease in wheat. The hollow cone nozzle showed

a uniformity of the spray distribution with the production of very fine droplets, however it was not as efficient as the plane jets nozzles to control the disease. Nozzles DB 110015 and TJ60 11002, produced fine droplets and were similar to the parameters evaluated.

Key words: *Pyricularia oryzae*, *Triticum aestivum*, diversity, fungicides.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.), mundialmente é um dos cereais mais expressivos, o consumo médio anual fica em torno de 608 milhões de toneladas com uma produção média de 701 milhões de toneladas. No Brasil, nas últimas quatro safras (2011/2012 a 2014/2015), a produção média de trigo foi de 5.416,75 milhões de toneladas, para um consumo interno (moagem industrial e semente) de 10.593,6 milhões de toneladas. Mesmo que não houvesse a exportação do valor de 1.328,2 milhões de toneladas, a necessidade de importação ficaria em torno de 6.000,00 milhões de toneladas (ABITRIGO, 2016). Devido a sua importância econômica e social, o trigo ocupa papel de destaque dentre os cereais produzidos, no entanto, a ocorrência de doenças como a brusone, tem levado a uma baixa exploração de seu potencial produtivo, em especial no Centro-Oeste brasileiro (ARRUDA et al, 2005).

O fungo *Magnaporthe oryzae* B. Couch (anamorfo *Pyricularia oryzae* Cavara), agente causal da brusone, tem como característica atacar toda parte aérea do trigo, mas o sintoma mais característico é observado nas espigas, conhecido como “chochamento dos grãos” (IGARASHI, 1988). O patógeno é considerado praga quarentenária para a agricultura americana (STRANGE & SCOTT, 2005), podendo sobreviver na forma de micélio ou conídio, em restos de culturas ou sementes, onde a eficiência de transmissão é de 32 a 64 % (TOLEDO, 2004).

O controle genético da brusone, tanto na cultura do arroz quanto no trigo, é realizado principalmente pelo uso de

cultivares resistentes. Entretanto, devido ao reduzido intervalo de tempo em que os materiais permanecem resistentes após serem lançados, esse método cada vez mais, se torna ineficiente. Em arroz, esse fato pode ser explicado pela exposição inadequada dos materiais à diversidade populacional de *M. oryzae* durante as etapas dos programas de melhoramento, ou a alta variabilidade do patógeno, nesse caso, ocorrendo o desenvolvimento de novas raças que superam o gene de resistência (LEUNG et al., 1988).

A variabilidade patogênica de *M. oryzae*, em arroz, foi descrita por Ou & Ayad (1968), que verificaram que o patógeno produz em alguns casos, raças diferentes originadas de uma mesma lesão, podendo esta variabilidade interferir em uma maior adaptação a hospedeiros distintos. Em trigo, Maciel et al. (2014), estudando 150 isolados de *M. oryzae* do trigo em uma série diferenciadora de raças de cultivares comerciais de trigo, encontraram a presença de 8 grupos de virulência do patógeno para a região Centro-Sul do Brasil. A adaptação de *M. oryzae* à novos hospedeiros, foi evidenciada em trigo para várias plantas invasoras, principalmente as da família Poaceae (URASHIMA & KATO, 1998; GALBIERI & URASHIMA, 2008; MACIEL et al, 2013). Entretanto, na maioria das vezes, esta relação, patógeno-planta, foi descrita somente como uma forma de sobrevivência do fungo, não explorando o papel destas invasoras na variabilidade de *M. oryzae* em trigo.

Quanto ao manejo químico, a aplicação de fungicidas é uma técnica oficial integrante dentre as opções de controle das doenças de parte aérea do trigo desde 1976 (REIS

& LUZ, 1976), entretanto, uma alternativa que não tem apresentado uso justificável em anos em que há condições favoráveis ao desenvolvimento da brusone, pois a eficiência média de controle é cerca de 50 % (GOULART, 2005). Esta ineficácia pode ser atribuída ao desconhecimento da biologia do patógeno e da sobrevivência do mesmo em restos de cultura, sementes, ou presença de hospedeiros alternativos; às dificuldades de deposição dos fungicidas nas espigas; à alteração da sensibilidade do patógeno a fungicidas específicos (GOULART et al, 1995; PAGANI et al, 2014), dentre outros.

O presente trabalho teve como objetivos: (a) identificar e caracterizar sexualmente *in vitro* os idiomorfos de *M. oryzae*; (b) avaliar o potencial *in vivo* dos isolados de *M. oryzae* de plantas invasoras em contribuir com a variabilidade de *M. oryzae* do trigo; (c) avaliar a sensibilidade de isolados de *M. oryzae* aos fungicidas que agem sobre a germinação de conídios e sobre o crescimento miceliano do patógeno; (d) avaliar a deposição da calda proporcionada por três pontas de pulverização com três volumes de calda diferentes, para o controle da brusone do trigo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ocorrência da brusone do trigo

O fungo *Magnaporthe oryzae* B. (Couch), anamorfo *Pyricularia oryzae* (Cavara), é o agente causal da brusone do trigo (COUCH & KOHN, 2002). Dentre os vários hospedeiros estão às plantas da família Poaceae, espécies de interesse agrônomo, como: arroz (*Oryza sativa* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), milheto (*Pennisetum americanum* L.), milho (*Zea mays* L.), triticale (x *Triticosecale* Wittmack), centeio (*Secale cereale*, e azevém (*Lolium multiflorum* L.) (URASHIMA & KATO, 1998).

A doença foi descrita pela primeira vez causando danos em arroz em 1637 na China, devido aos sintomas a doença foi denominada de “febre-do-arroz” (PRABHU & FILIPPI, 2006). No Japão foi descrita em 1704 sendo denominada de *imochi-byo*, após, em 1828 foi encontrada na Itália, onde foi chamada de *brusone*, cujo nome comum prevaleceu (OU, 1985). No Brasil, a primeira constatação em arroz, foi em 1912 no estado de São Paulo, na cultura do arroz (PRABHU & FILIPPI, 2006), e em trigo, Igarashi et al. (1986), observaram pela primeira vez essa doença, em meados de 1985, sob condições naturais de infecção, no estado do Paraná, sendo este o primeiro relato acompanhado de perdas significativas. Posteriormente, o patógeno foi encontrado no estado do Mato Grosso Sul (GOULART et al., 1989), Rio Grande do Sul

(PICININI & FERNANDES, 1989) e Goiás (PRABHU et al., 1992).

Os relatos de maior ocorrência da brusone em trigo estão no Brasil, Paraguai e Bolívia. No norte da Argentina foi descrita em 2007 (CABRERA & GUTIÉRREZ, 2007), no entanto fora da América do Sul, o patógeno ainda não foi relatado causando infecção natural em trigo (REIS et al., 2014; MACIEL et al., 2014). Ressalta-se que, os países autorizados a exportar trigo semente para o Brasil, o Uruguai, o Paraguai e a Argentina (ABITRIGO, 2016), são justamente os países onde há relatos da ocorrência da doença. A semente apesar de não ser considerado o principal meio de sobrevivência do patógeno é um veículo de disseminação passiva (REIS et al., 2014).

O fitopatógeno *M. oryzae*, tem como característica levar ao declínio da cultura do trigo pela redução no rendimento, na qualidade dos grãos e no peso de grãos por espiga, isso influenciado pela época da infecção. A intensidade dos sintomas varia em função da região, das condições climáticas e da cultivar em questão (GOULART & PAIVA, 2000; GOULART et al., 2007).

No centro-oeste brasileiro, a cultura do cereal é conduzida em sistema irrigado ou sequeiro. O primeiro sistema, realizado sob pivô central, fornece ambiente favorável para a ocorrência de doenças fúngicas. O segundo, com a semeadura realizada nos meses de fevereiro até março, associa temperaturas altas e chuvas frequentes na fase do espigamento, o que potencializa a ocorrência da brusone. Sendo assim, a brusone é

um fator limitante à expansão de trigo no Brasil Central, que precisa ser superado (MACIEL et al., 2013).

Nos estados do sul do Brasil, a ocorrência de brusone na cultura do trigo não é comum, entretanto na safra 2014, verificou-se na região Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, incidência de espigas com sintomas de brusone, com níveis de 5 a 10 %, podendo ter atingido valores maiores do que esses em algumas lavouras. A epidemia ocorrida na safra de trigo em 2014, no sul do Brasil é um fato novo, e mesmo em regiões mais frias como no município de Guarapuava (PR) foi registrada a presença da brusone em trigo (REIS et al., 2014).

2.2 Ciclo da doença

O patógeno pode sobreviver na forma de micélio dormente ou conídio, em restos de culturas, em sementes por até 22 meses (REIS et al., 1995), e em hospedeiros secundários. Os hospedeiros secundários se caracterizam como a principal fonte de inóculo para este hemibiotrófico. A liberação e a disseminação dos conídios podem ser atribuídas ao vento em até 1.000 m de distância (URASHIMA et al., 2007), preferencialmente a noite com temperaturas próximas a 22 °C e umidade relativa do ar de 100 % (ESPINOZA & SHOHARA, 2003). A presença de água livre serve para germinação do patógeno e exsudação de mucilagem armazenada no ápice do conídio, que servirá de apoio para fixação do mesmo na superfície do hospedeiro (EBBOLE et al., 2007).

Após a formação do apressório, 2 a 4 horas após a disseminação das células assexuais, ocorre a biossíntese de melanina que age aumentando a parede externa do apressório (HOWARD & VALENT, 1996). A biossíntese de melanina é característica de *M. oryzae* do arroz, entretanto para *M. oryzae* do trigo, não há estudos. Ocorrida a penetração, após 5 dias há produção de toxinas que destroem os tecidos vegetais do hospedeiro com a manifestação externa dos sintomas (RIBOT et al., 2008). Estes últimos, podem variar de acordo com o estágio da cultura e local infectado, em geral nas folhas as lesões são com centro claro esbranquiçado e margens marrom claro. Nas espigas, há um ponto de infecção enegrecido brilhante no ráquis, e deste para cima, há o branqueamento das espiguetas pela interrupção do transporte de seiva (PICININI & FERNANDES, 1995; TOLEDO, 2004).

A produção de inóculo é responsável pelos ciclos secundários do fungo que aumentam a doença no campo (PAGANI, 2011), e o período latente varia de 4-6 dias para temperaturas de 9-11 °C, e de 13-18 dias para temperaturas de 26-28 °C (BARKSDALE & ASAI, 1961).

A variação entre os isolados, inclusive de uma mesma raça, quanto ao desenvolvimento e a disseminação, quanto ao índice de velocidade do crescimento micelial, coloração e diâmetro colonial, porcentagem de germinação dos conídios, e dimensões dos conídios, são algumas das características que reforçam a variabilidade de *M. oryzae* (SOUZA et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

2.3 Variabilidade genética de *Magnaporthe oryzae*

A variação genética dentro da estrutura populacional de uma espécie depende da sua história evolucionária, varia com o tempo e o espaço, ou adapta-se em resposta às alterações nas condições ambientais (PRABHU & FILIPPI, 2006). Em arroz é comum a descrição de grupos raciais formando a estrutura populacional de *M. oryzae*, 16 raças foram detectadas em variedades de arroz de terras altas do Estado do Tocantins (FILIPPI & PRABHU, 2001) e 22 em áreas de produção de arroz no Estado de São Paulo (URASHIMA, 2002).

Em relação a *M. oryzae* do trigo os poucos trabalhos existentes indicam que a estrutura populacional deste fungo, também é composta por grupos raciais, e que esses provavelmente contribuem para a alta variabilidade do patógeno (MACIEL et al., 2014). Além disso, o grande número de hospedeiros onde este fungo é encontrado, também é indicado como fonte de variabilidade (GALBIERI & URASHIMA, 2008; MACIEL et al., 2013). A importância dos diferentes hospedeiros de *M. oryzae* reside no fato de existir a migração ou difusão de genes entre os isolados dessas populações (PRABHU & FILIPPI, 2006).

Ao se estudar molecularmente isolados de *M. oryzae* de poáceas invasoras de lavouras de milho, encontrou-se pelo menos oito haplotipos de isolados de invasoras semelhantes ao isolado de milho, mostrando a importância destes hospedeiros secundários na epidemiologia da brusone (TAKAN et al, 2012). E, a similaridade de virulência entre isolados de braquiária e

capim sudão com isolados de trigo, é forte indicativo da influência dos hospedeiros secundários sobre o desenvolvimento da estrutura populacional do patógeno (DANELLI, 2015).

Muitos fatores podem contribuir para a geração da variabilidade. Dentre esses, o ciclo sexual, a recombinação parassexual e as mutações são os principais (KUMAR et al., 1999; OU, 1985; ZEIGLER et al., 1997). Eles podem ocorrer separadamente ou conjuntamente, e levar ao polimorfismo cromossômico e ao rearranjo do genoma (KISTLER & MIAO, 1992; O'SULLIVAN et al., 1998). Análise de DNA *fingerprint* do elemento MGP586, pela técnica Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), de isolados de *M. oryzae* do arroz dos Estados Unidos e da Ásia, mostrou a existência de uma população clonal do patógeno, o que não justificaria a alta variabilidade encontrada. Entretanto, existência da transferência de segmentos de DNA de um isolado para outro via parassexualidade foi a documentada como a fonte geradora desta variabilidade, em laboratório (ZEIGLER et al., 1997), e a população clonal atribuída a alta taxa de reprodução do patógeno. Em isolados de *M. oryzae* do arroz, do Uruguai, já foi relatado a incidência de fluxo gênico via assexuada, por sementes, interferindo na estrutura populacional e gerando a variabilidade (TAHERI & IRANNEJAD, 2013).

2.4 Reprodução sexual

A estrutura reprodutiva característica da reprodução sexual em Ascomycetes, como no caso de *M. oryzae*, é do tipo

“ascoma”, denominada de peritécio, contendo em seu interior as ascas, nas quais estão os esporos sexuais, os ascósporos. Suas hifas heterotálicas apresentam um tipo de acasalamento controlado por um gene *mat* com dois alelos diferentes, MAT1-1 e MAT1-2. A recombinação sexual só ocorre entre isolados parentais, e se estes indivíduos forem férteis e apresentarem os alelos complementares 1 e 2 no loco MAT1 (PRABHU & FILIPPI, 2006).

Os genes MAT1-1 e MAT1-2, localizados no cromossomo três do genoma de *M. oryzae*, codificam transcritos (MAT1-1-1, MAT1-1-2, MAT1-1-3, MAT1-2-1 e MAT1-2-2) resultando em diferentes expressões proteicas. A deleção de algum loco reduz a quantidade dos transcritos e interfere negativamente na existência de órgãos sexuais férteis e assim na existência do ciclo sexual (MOREIRA & CERESINI, 2015).

O ciclo sexual ocorre, muitas vezes, após sucessivos ciclos assexuais, quando as condições ambientais tornam-se desfavoráveis para o patógeno, o qual deverá sobreviver à custa dos seus ascomas e ascósporos (MASSOLA Jr & KRUGNER, 2011). Os esporos sexuais resultam da plasmogamia, seguida de cariogamia com formação de um núcleo diploide, e de meiose que restaura o estado haplóide (ALEXOPOULOS et al., 1996; AZEVEDO, 2008). Uma vez ocorrida a fusão de núcleos, combinações diversas de material genético originam as mais variadas apresentações de genótipos e fenótipos (GALBIERI & URASHIMA, 2008).

Em isolados de trigo, os primeiros relatos da ocorrência de fase sexual de *M. oryzae* foram em 1993, onde

93% dos isolados testados formaram peritécios, e desses, 68 % formaram órgãos sexuais completos (peritécio, ascas e ascósporos) (URASHIMA et al., 1993). Ao se estudar a inter-relação sexual entre isolados de *M. oryzae* de diversos hospedeiros, demonstrou-se a existência de tipos compatíveis entre isolados de trigo e *Brachiaria plantaginea*, *Eleusine coracana* e *Setaria* spp., os quais foram capazes de produzir estruturas reprodutivas (peritécios) (BRUNO & URASHIMA, 2001). A alta fertilidade demonstrada por isolados de *M. oryzae* obtidos de plantas de trigo reforça a perspectiva de que esses variantes do patógeno tem sua variabilidade influenciada por eventos de recombinação sexual.

2.5 Parassexualidade

A recombinação parassexual é um dos mecanismos que facilita a ocorrência de variabilidade para fungos imperfeitos. É alternativa, para fungos perfeitos, e de suma importância, no melhoramento de fungos de valor industrial. Descrita a partir de 1970, ocorre, anastomose de hifas em forma de H ou adjacentes, com troca ou passagem do núcleo e fusão dos mesmos, com obtenção de um diploide recombinante, o *heterocarium* (AZEVEDO, 2008). Este reconhecimento vegetativo entre hifas é governado pelo loco *het*, ou seja, se as hifas diferirem para este loco, as células heterocarióticas são rapidamente destruídas ou há inibição do crescimento do indivíduo recombinante (SAUPE, 2000), contrariamente, se as

hifas foram compatíveis, há a migração nuclear seguida de cariogamia e formação do indivíduo variante (GLASS, 2000).

A incompatibilidade tem por função manter a individualidade genética (SAUPE, 2000), já a compatibilidade vegetativa (VCG) permite descrever os membros de um mesmo grupo que são capazes de trocar informações genéticas (LESLIE, 1993). Isolados de *M. oryzae* de arroz, do estado de Santa Catarina, ao serem avaliados quanto à capacidade de recombinação parassexual, em laboratório, revelaram a identidade alélica para loco *het*. E isso implicou no surgimento de isolados virulentos que reduziram a efetividade de genes maiores de resistência das cultivares de arroz, comprometendo o melhoramento genético das cultivares (SCHEUERMANN, 2002).

A frequência da recombinação parassexual é uma questão crítica, e não está bem esclarecida em condições de campo. Características relativas à estabilidade e aptidão dos recombinantes parassexuais, estão atreladas às condições de sobrevivência em ambientes inóspitos (NOGUCHI et al., 2006).

2.6 Mutações

As mutações são as alterações no material genético de um microrganismo, em nível de DNA ou RNA, resultando num organismo diferente do original em uma ou mais características genéticas (AZEVEDO, 2008). No caso de *M. oryzae*, a existência de sítios quentes (*hot-spot*), que facilmente mutam uma base nitrogenada, tem resultado em isolados

resistentes a fungicidas como as estrobilurinas (CASTROAGUDÍN et al., 2015). A causa desses pontos quentes e de mutações espontâneas, são as regiões de sequências repetidas próximas, no mesmo gene, desalinhando o DNA com permutas desiguais, com adições ou deleções (NETO et al., 2010).

O fitopatógeno *M. oryzae*, apresenta um genoma altamente instável em consequência da presença dos elementos transponíveis em nível de DNA (CHADHA & SHARMA, 2014). Alguns transposons com elementos promotores podem ativar genes adjacentes antes inativos, ou alterar o seu padrão de expressão (REGNER & LORETO, 2003), e com isso, beneficiar o patógeno com uma rápida adaptação a diferentes condições ambientais (XUE et al., 2012).

Alguns estudos revelaram a influência de elementos do tipo transposons no ganho de virulência para o gene *Pi-ta* e a perda de função do gene *Avr* correspondente, esta mutação espontânea foi caracterizada pela inserção de um transposon da família *Pot-3*, demonstrando assim, que estes elementos podem ser responsáveis por mudar o espectro de virulência em *M. oryzae*, sendo um importante mecanismo de variabilidade genética (KANG et al., 2001).

2.7 Marcadores moleculares e a variabilidade genética de *Magnaporthe oryzae*

O desenvolvimento de tecnologias que permitam a monitorização da dinâmica das populações de fungos, é

fundamental na concepção de estratégias para o controle das doenças (BRONDANI et al., 2000). A genética molecular, com seus recursos para detectar o polimorfismo diretamente no DNA, tem contribuído para a caracterização genética de populações de fungos e estimar a diversidade de *M. oryzae* (GARRIDO et al., 2001).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélite *Simple Sequence Repeat* (SSR), estão entre os mais utilizados devido a rapidez, uma vez que sequências repetitivas de DNA estão distribuídas por todo o genoma do patógeno (WEISING et al., 1995; BRONDANI et al., 2000; KAYE et al., 2003; WANG et al., 2005). Os marcadores do tipo SSR são sequências de um a seis nucleotídeos que se apresentam repetidos lado a lado na fita de DNA (TAUTZ, 1989), e com capacidade de apresentar alta diversidade de alelos por locus (CREGAN et al., 1994). A grande vantagem desses marcadores é a reprodutibilidade, o alto nível de polimorfismo detectado, e a necessidade de uma pequena alíquota de DNA extraído, podendo ser usados em estudos com grande número de acessos (FALEIRO, 2007).

Sequências repetitivas longas já foram descritas e estudadas no genoma de *M. oryzae*, como as repetições MGR, uma sequência repetitiva de 1.860 pb, com uma estimativa média de 46 cópias por genoma (HAMER, 1991). Alguns retrotransposons repetitivos como GRH e MAGGY foram também detectados no genoma de *M. oryzae*, com cerca de 50 cópias por genoma (DOBINSON et al., 1993; FARMAN et al., 1996).

Para melhorar o estudo da variabilidade genética de *M. oryzae* do trigo do Brasil, foram desenvolvidos na Embrapa Trigo 38 marcadores SSR a partir da construção de uma biblioteca genômica de *M. oryzae* do trigo (PEREIRA et al., 2014). Os mesmos foram utilizados para caracterizar molecularmente 31 isolados de *M. oryzae* obtidos de diferentes áreas de quatro estados brasileiros produtores de trigo. Quanto ao conteúdo de informações polimórficas (*Polymorphism Information Content* - PIC) dos marcadores contruídos, 10,5% mostraram $PIC > 0,5$, sendo classificados como de alta informação polimórfica, 18,4% como de razoável informação polimórfica, com PIC entre 0,25 e 0,5, e 10,5% como ligeiramente informativo, com $PIC < 0,25$, e o restante dos marcadores, como monomórficos com $PIC = 0$. Quanto à variabilidade da população de isolados estudada, os marcadores permitiram identificar que os isolados dos estados do Paraná e de Minas Gerais apresentaram mais polimorfismo do que os isolados dos estados de Goiás e do Rio Grande do Sul. E ainda, um isolado de arroz utilizado no estudo, mostrou-se geneticamente distinto dos isolados do trigo com os marcadores propostos, reforçando as diferenças genéticas já existentes e documentadas entre *M. oryzae* do arroz e do trigo.

2.8 Controle químico da brusone do trigo

A existência da diversidade genética de isolados de *M. oryzae* tem limitado a disponibilidade de cultivares resistentes à brusone, sendo assim, o controle químico de parte

aérea, ainda é a principal alternativa utilizada no manejo da cultura por parte dos produtores. Os trabalhos mostram satisfatório controle da doença em folhas, mas não em espiga, que constitui a parte econômica do trigo (ROCHA et al., 2014). O controle químico deve levar em consideração aspectos importantes como a biologia do patógeno, a fonte de inóculo primário, a importância dos restos de cultura e das plantas invasoras que hospedam o patógeno, e a dificuldade técnica de proteção da espiga (PAGANI et al., 2014). A utilização de fungicidas para o controle de doenças de parte aérea da cultura do trigo no Brasil, é considerada indicação técnica oficial desde 1976 (REIS & LUZ, 1976).

Trabalhos investigando a eficiência de fungicidas no controle da brusone do trigo, em diferentes genótipos, mostraram a superioridade dos fungicidas epoxiconazol+piraclostrobina e de tebuconazol+trifloxistrobina, em relação à testemunha para todos os genótipos avaliados, para os parâmetros área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), e severidade em folha bandeira. No entanto, nenhum foi capaz de controlar a doença em espigas (ROCHA et al., 2014). A aplicação foliar de produtos químicos para a redução da severidade da brusone do trigo, mostrou que os indutores de resistência fosfito de potássio e etefon, apresentaram potencial fungitóxico para *M. oryzae* do trigo, mas é dependente do nível de resistência basal da cultivar de trigo (CRUZ et al., 2011).

2.9 Sensibilidade e fungitoxicidade

A fungitoxicidade é um atributo atrelado à molécula do fungicida, e a sensibilidade relacionada à espécie do fungo. Portanto, o produto químico, em razão de suas características moleculares, apresenta fungitoxicidade (é tóxico ao fungo). Por outro lado, o fungo, em razão de suas características genéticas, apresenta ou não sensibilidade a uma dada molécula. Todos os fungos dentro do espectro de ação de um fungicida são considerados sensíveis. Se o fungicida não apresenta fungitoxicidade, é dito atóxico, e o fungo é considerado insensível, atributo que depende das interações entre as características da molécula e da genética do fungo (GHINI & KIMATI, 2000; REIS et al., 2010).

Um fungo sensível a uma molécula fungicida pode ter a sensibilidade reduzida, razão por que se diz que desenvolveu resistência, porém, um insensível nunca se tornará sensível (REIS et al., 2010). A sensibilidade é o oposto de resistência, pois todas as linhagens resistentes apresentam uma redução da sensibilidade, porém, a palavra insensibilidade não deve ser usada como sinônimo de resistência, pois esse termo sugere a completa falta de sensibilidade e só deve ser usado para descrever fungos para os quais os fungicidas nunca tiveram nenhum efeito (GHINI & KIMATI, 2000).

Edgington et al. (1971), propõem os seguintes critérios para classificar uma substância fungicida, com relação a fungitoxicidade: substância que apresenta $CI_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ = altamente fungitóxica; com CI_{50} entre 1 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} =

moderadamente fungitóxica e com $CI_{50} > 50 \text{ mg L}^{-1}$ = não tóxica. O termo CI_{50} corresponde à concentração inibitória que promove um efeito desejado (ou grau de resposta) em 50% dos microrganismos submetidos ao ensaio experimental (OGA et al., 2008; REIS et al., 2010). Se a CI_{50} de um fungicida, ao longo do tempo, apresentar alteração para valores superiores aos inicialmente estabelecidos, visando ao controle de um determinado patógeno, isso poderá indicar redução na sensibilidade àquele fungicida (REIS et al., 2010).

O estudo da sensibilidade de fungos a fungicidas é realizada há algum tempo, e em diferentes patossistemas. Em trigo o fungo *Septoria tritici* Rob. ex Desm. (teleomorfo *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter) apresentou resistência a fungicidas do grupo das estrobilurinas. O primeiro relato foi no Reino Unido, em 2001, em uma frequência baixa. Durante as safras seguintes a resistência chegou a altas frequências no Norte da Europa (TORRIANI et al., 2009; BEYER et al., 2011).

No patossistema trigo-mancha amarela foi estudada a sensibilidade de isolados de *Drechslera tritici-repentis* (Died) Shoemaker e de *D. siccans* (Drechsler) Shoemaker a fungicidas dos grupos químicos triazóis e estrobilurinas, os valores da CI_{50} foram variáveis e mostraram alteração da sensibilidade para os isolados testados, ficou comprovado que a eficácia do controle da mancha amarela do trigo está relacionada à fungitoxicidade dos triazóis, sendo assim, não recomendado usar fungicidas do grupo das estrobilurinas isoladamente no controle da doença (TONIM, 2012).

Com o objetivo de monitorar a sensibilidade do agente causal da giberela em trigo, determinou-se a CI_{50} para dez isolados de *F. graminearum* para triazóis, estrobilurinas e misturas de triazóis+estrobilurinas. Encontrou-se diferença de sensibilidade entre os isolados, e elevada fungitoxicidade para metconazol, protioconazol e tebuconazol. No entanto, pode-se inferir que não basta um fungicida ser potente se a tecnologia de aplicação não é suficientemente eficaz para depositar quantidades suficientes dos fungicidas nas espigas (AVOZANI et al., 2014).

Para *M. oryzae* do trigo, molecularmente foi encontrado um grupo de oito isolados sensíveis a azoxistrobina, e outro com oito isolados resistentes ao mesmo princípio ativo. A partir de então se procurou determinar, *in vitro*, os valores de CI_{50} pra esses dois grupos. E o resultado mostrou que os isolados sensíveis apresentaram CI_{50} média de 0,0077 mg L⁻¹ enquanto que os resistentes, média de 0,3205 mg L⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2015).

2.10 Tecnologia de aplicação de fungicidas

Por conceito, tecnologia de aplicação consiste no emprego de todos os conhecimentos científicos que propiciam uma melhor e eficaz deposição de agroquímicos, visando atingir o alvo com o princípio ativo, em quantidade necessária, de maneira econômica e com a menor contaminação de outras áreas (MATUO, 1990).

Embora todos os componentes de um pulverizador sejam essenciais para a aplicação de produtos químicos, as pontas de pulverização são os componentes mais importantes (ANTUNIASSI & BOLLER, 2011). As pontas também são os componentes que mais geram prejuízo ao produtor, pelo entupimento, desgaste, e escolha errada, todos gerando falhas na aplicação (CUNHA & SILVA, 2010). Sempre que a vazão de uma ponta ultrapassar 10% da vazão nominal estipulada pelo fabricante, essa ponta deverá ser substituída por uma nova (ANTUNIASSI & BOLLER, 2011). Da correta seleção da ponta de pulverização depende a penetração e a deposição da calda na cultura, e como consequência, a eficácia do controle químico (MATUO, 1990). Cada tratamento químico requer um determinado modelo de ponta que melhor se adapte às características desejadas, no que se refere ao local de deposição das gotas, volume de aplicação e tamanho das gotas (MÁRQUEZ, 1997).

Deve-se dar preferência para pontas que produzam gotas menos heterogêneas, com distribuição uniforme e precisa do volume escolhido ou desejado (SANTOS, 2007). Pontas de jato cônico vazio são apropriadas para aplicações dirigidas e pontas de jato plano para aplicações de fungicidas em pulverizadores de barra (CHRISTOFOLETTI, 1999). As pontas de jato cônico trabalham em pressões mais elevadas (200 a 1000 kPa), logo o diâmetro da gota é reduzido. A distribuição em cone vazio é em forma de U com ângulo de abertura de 60 a 80°, sem gotas na região central atingida pelo jato (CUNHA & TEIXEIRA, 2001; RODRIGUES et al., 2012). As pontas de jato

plano, apresentam jato elíptico em pressões geralmente entre 100 e 400 kPa. As pontas de jatos planos duplos produzem dois jatos planos tipo leque, com ângulos de abertura de 80° a 110°, e divergentes entre si com um ângulo de 60°. Este jato duplo inclinado, permite que um mesmo bico aplique duas vezes na mesma planta, sendo indicado para uso em culturas fechadas e com alta densidade foliar (CUNHA & SILVA, 2010; CUNHA & RUAS, 2006).

Uma forma auxiliar para o estudo e escolha correta das pontas de pulverização e do ajuste do volume a ser aplicado, é a avaliação do espectro de pulverização, utilizando alvos artificiais, como papéis sensível a água, colocados próximos aos alvos verdadeiros (ANTUNIASSI, 2006). A maior limitação do emprego dos cartões hidrossensíveis é a umidade relativa do ar acima de 80%, pois afeta a sensibilidade do papel (SCHRÖDER, 1996). O espectro de gotas é a classificação por classes de tamanho em porcentagem de volume ou de número de gotas, sendo que se deve buscar homogeneidade das gotas. A densidade de gotas é expressa pelo número de gotas por unidade de área, correspondendo à quantidade de produto ativo depositado sobre o alvo, e o diâmetro das gotas, seja o mediano volumétrico ou mediano numérico, indicam o potencial de perda do produto, por deriva ou evaporação (VELLOSO et al., 1984).

Aumentar o volume de água e a pressão sobre o líquido pulverizado até a formação de gotas pequenas resulta na falsa impressão de melhor molhamento do alvo, no entanto, a névoa formada por gotas com diâmetro inferior a 100 µm, é volatilizada ou arrastada, não atingindo o alvo (GASSEN,

2003). Gotas menores que 50 μm permanecem suspensas no ar até a completa evaporação (RAMOS, 2000). E, gotas com diâmetros iguais ou superiores a 200 μm , pouco sofrem deriva com a umidade relativa na faixa de 20 a 100 % (ZHU et al., 1994).

Os principais fatores ambientais que influenciam a qualidade da pulverização são a temperatura, a umidade relativa do ar, a umidade do solo, a velocidade do vento e o orvalho. Quanto a umidade relativa do ar, a mínima deve ser de 60 % para operações de pulverização (RUEDELL, 1995), e quanto ao orvalho, é benéfico à planta por aumentar a duração do molhamento, mas exige atenção pois provoca escorrimento das gotas pulverizadas (MAROCHI, 1995). O orvalho pode até melhorar a eficiência de fungicidas pela redistribuição do produto na planta, podendo possibilitar a redução do volume de calda de pulverização e aumentar a autonomia do pulverizador (MENEGHETTI, 2006). A redução do volume de calda aplicado sobre o alvo biológico, agiliza a aplicação de defensivo dentro das condições climáticas favoráveis, e libera equipamentos, máquinas e mão-de-obra para outras atividades (MAROCHI & SCHMIDT, 1996). Mas para isso, é necessário o uso de gotas menores e mais uniformes para adequada cobertura do alvo (MATUO, 1990).

Ao se estudar o efeito do volume de aplicação com uma ponta leque sobre a cobertura de alvos planos, observou-se um aumento significativo de cobertura quando o volume de aplicação passou de 100 para 200 L ha⁻¹, não diferindo quando esse volume passou para 300 L ha⁻¹ (TEIXEIRA et al., 1998).

Por outro lado, a redução do volume de pulverização pode não permitir que o fungicida expresse o seu potencial no controle da doença (SAUER, 1999). O volume de calda utilizado requer aprimoramento das tecnologias, uma vez que é dependente do tipo de aplicação, das características do alvo e das condições ambientais (MATUO, 1990).

CAPÍTULO I

Magnaporthe oryzae: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IDIOMORFOS E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

CRISTINA BOARETTO¹

RESUMO – Dentre os fatores responsáveis pela ineficiência das estratégias de controle da brusone do trigo, está a alta variabilidade do fungo *Magnaporthe oryzae* B. Couch. Entretanto, vários aspectos referentes à variabilidade genética, fenotípica e patogênica do patógeno são desconhecidos. O presente trabalho teve como objetivos (a) identificar e caracterizar sexualmente idiomorfos de *M. oryzae*; (b) analisar a variabilidade genética de isolados de *M. oryzae* do trigo e de poáceas invasoras de trigo; e (c) identificar a ocorrência da variabilidade genética em infecções conjuntas em plantas de trigo de idiomorfos compatíveis de *M. oryzae* do trigo e de poáceas invasoras de trigo. A identificação e caracterização dos idiomorfos quanto à presença de estruturas sexuais foi realizada visualmente e a análise da variabilidade genética foi realizada por meio de técnicas moleculares de genotipagem. Na população estudada de *M. oryzae* do Brasil, prevaleceu o idiomorfo MAT1-1 (85,84% dos isolados testados), com presença de órgãos

¹ Eng^a. Agr^a., mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, bolsista CAPES/Embrapa, Projeto “*Magnaporthe oryzae*: O desafio da tropicalização do trigo no Brasil.”

sexuais completos em apenas 4 isolados e, hermafroditismo, somente entre os isolados de plantas invasoras. Dependendo da combinação utilizada, com um isolado de *M. oryzae* do trigo e um isolado de *M.oryzae* de uma das 12 espécies de plantas invasoras utilizados nos experimentos, os isolados recuperados das inoculações conjuntas diferiram dos isolados originais usados nas inoculações. Os isolados que foram mais similares aos isolados de trigo foram os obtidos de *Eleusine indica*, de *Rhynchelytrum repens*, de *Cenchrus echinatus*, de *Brachiaria* spp., de *Sorghum sudanense*, de *Chloris* spp., de *Echinochloa* spp., e de *Elionurus candidus*. Enquanto que os mais dissimilares foram os de *Eragrotis plana* e de *Digitaria sanguinalis*. A diferença genética indentificada nos isolados recuperados, quando comparada com os isolados utilizados nas inoculações, é um importante indicativo de que algumas plantas invasoras da cultura do trigo, como *Sorgum sudanense*, *Chloris* spp., *Brachiaria* spp., *Echinochloa* spp., e *Rhynchelytrum repens* exercem papel importante na geração de variabilidade de *M. oryzae* do trigo.

Palavras-chave: mating types, brusone do trigo, hospedeiros.

***Magnaporthe oryzae*: IDENTIFICATION AND
DESCRIPTION OF IDIOMORPHS AND ANALYSIS
OF THE GENETIC VARIABILITY**

ABSTRACT - Among the factors responsible for the inefficiency of the wheat blast control strategies, is the high

variability of the fungus *Magnaporthe oryzae* B. Couch. However, several aspects related to the pathogen's genetic, phenotypic and pathogenic variability are unknown. This study aimed to (a) to sexually identify and characterize in vitro the idiomorphs *M. oryzae*; (b) to analyze the genetic variability of isolates of *M. oryzae* and poaceae on wheat; and (c) to identify the occurrence of genetic variability in joint infections in idiomorphs wheat plants compatible *M. oryzae* and poaceae on wheat. The identification of idiomorphs and of the presence of sexual organs was visual, and the identification of sexual reproduction was done with molecular techniques and genotyping. In the study population of *M. oryzae* in Brazil, the MAT1-1 (85,84 % of the tested isolates) idiomorph prevailed, with the presence of complete sexual organs in only 4 isolated, and hermaphroditism only between isolates of invasive plants. Depending on the combination used, with *M. oryzae* isolated from wheat and one *M.oryzae* isolated from one of the 12 invasive plant species used in the experiments, the recovered isolates from inoculations altogether differed from the original isolates used in the inoculations. The isolates which were most similar to wheat isolates were obtained from *Eleusine indica*, *Rhynchelytrum repens*, *Cenchrus echinatus* , *Brachiaria* spp., *Sorghum sudanense*, *Chloris* spp., *Echinochloa* spp., and from *Elionurus candidus*. While most dissimilar were *Eragotis plana* and *Digitaria sanguinalis*. The identified genetic difference in recovered isolates, compared to the isolates used in inoculations, is an important indication that some weeds in wheat cultivation, and *Sorghum sudanense*, *Chloris* spp.,

Brachiaria spp., *Echinochloa* spp., and *Rhynchelytrum repens* play an important role in generating variability of wheat *M. oryzae*.

Key words: mating types, wheat blast, hosts.

1 INTRODUÇÃO

Os danos importantes à cultura do trigo devido a ocorrência da brusone, foram relatados no Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina (DUVEILLER et al., 2010; KOHLI et al., 2010; CABRERA et al., 2010). No Brasil, Igarashi et al. (1986), descreveram pela primeira vez essa doença em plantas de trigo, em meados de 1985, no estado do Paraná. Posteriormente, o patógeno foi encontrado no estado do Mato Grosso do Sul (GOULART et al., 1989), Rio Grande do Sul (PICININI & FERNANDES, 1989) e Goiás (PRABHU et al., 1992).

Os sintomas da doença são causados em todas as partes da planta, com manchas elípticas em folhas, e branqueamento gradual das espigas. A severidade varia com as condições climáticas e com as cultivares utilizadas, e as perdas podem chegar a 100% (GOULART et al., 2007; WANG et al., 2014).

O uso da resistência genética mostra-se ineficiente no controle da doença, possivelmente, devido à alta variabilidade do patógeno, com o desenvolvimento de novas raças que superam os genes de resistência (PRABHU & FILIPPI, 2006). O grande número de hospedeiros que o fungo

habita é indicado como fonte de variabilidade (GALBIERI & URASHIMA, 2008; MACIEL et al., 2013). Isso se deve a capacidade de coexistir migração ou difusão de genes entre os isolados dessas populações.

Ao se estudar molecularmente isolados de *M. oryzae* de poáceas invasoras de lavouras de milho, encontrou-se pelo menos oito haplotipos de isolados de invasoras semelhantes ao isolado de milho, mostrando a importância dos hospedeiros secundários na epidemiologia da brusone (TAKAN et al, 2012). Para Ceresini et al. (2011) e Maciel et al. (2014), a população que infecta o trigo tem origem de uma população infestante de outras poáceas, ainda desconhecida, mas distinta do arroz.

A variabilidade em fungos, pode ser gerada por outros mecanismos, como a recombinação sexual, a parassexual e as mutações (KUMAR et al., 1999; OU, 1985; ZEIGLER et al., 1997). Existe evidências de que a reprodução sexuada seja uma fonte importante de variabilidade de *M. oryzae* (MACIEL et al., 2014; SALEH et al., 2012). A brusone mostra um alto grau de variação de patogenicidade no campo, embora esta poderia envolver mutação ou heterocariose no anamorfo, é provável que o teleomorfo contribua para a variação patogênica (HAYASHI et al., 1997).

A alta fertilidade demonstrada por isolados de *M. oryzae* obtidos de plantas de trigo reforça a perspectiva de que esses variantes do patógeno tem sua variabilidade influenciada por eventos de recombinação sexual (GALBIERI & URASHIMA, 2008). A formação de peritécios foi descrita pela primeira vez em 1971, para o gênero *Magnaporthe*, com o

cruzamento entre dois isolados de *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop, (HERBET, 1971). Em 1975, foi descrita a fase sexual de *Magnaporthe* de outras poáceas (UEYAMA & TSUDA, 1975). Em 1976, foi descrito a fase perfeita de *M. oryzae* de isolados de arroz (KATO et al., 1976; YAEGASHI & NISHIHARA, 1976).

Apesar de todos estes relatos serem em condições de laboratório, foram suficientes para demonstrar a característica heterotálica do fungo, o qual possui um sistema de acasalamento controlado por um gene *mat* com dois alelos diferentes, MAT1-1 e MAT1-2. A recombinação sexual só ocorre entre isolados parentais, e se estes indivíduos forem férteis e apresentarem os alelos complementares, 1 e 2 no loco MAT1 (PRABHU & FILIPPI, 2006).

A compreensão detalhada dos mecanismos apontados como possíveis causadores da variabilidade de *M. oryzae*, e da estrutura genética da população do fitopatógeno, pode colaborar com o desenvolvimento de estratégias que controlem eficazmente a evolução do agente causal da brusone na cultura do trigo, em especial na resistência durável. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: (a) identificar e caracterizar sexualmente idiomorfos de *M. oryzae*; (b) analisar a variabilidade genética de isolados de *M. oryzae* do trigo e de poáceas invasoras de trigo; e (c) identificar a ocorrência da variabilidade genética em infecções conjuntas em plantas de trigo de idiomorfos compatíveis de *M. oryzae* do trigo e de poáceas invasoras de trigo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas instalações da Embrapa Trigo. No Laboratório de Fitopatologia foram feitas repicagens, meios de cultura e preparo de inoculações. Em casa-de-vegetação e câmaras de crescimento foram realizadas as inoculações, e a avaliação genética com uso de marcadores moleculares foi realizada no Laboratório de Biotecnologia.

2.1 Coleção dos isolados de *Magnaporthe oryzae*

Foram utilizados isolados monospóricos, 100 isolados do trigo e 20 isolados de diferentes espécies de plantas invasoras, que pertencem à coleção de fungos da Embrapa Trigo. Coletados em lavouras de sete estados brasileiros no ano de 2012 (Tabela 1), conservados em papel filtro e em temperatura de -20 °C . Os isolados de trigo estão identificados como PY 12.1.XXX, e os isolados de plantas invasoras como PY 12.0.XXX. O número “12” refere-se ao ano da coleta de 2012, o “1” ou “0” ao hospedeiro, e em seguida “XXX” ao número individual de cada isolado na coleção Embrapa Trigo.

Tabela 1 – Origem geográfica, hospedeiro e identificação dos isolados de *Magnaporthe oryzae* e *Magnaporthe grisea* Passo Fundo–RS, 2016

Município/UF	Nº. de isolados	Hospedeiro de isolamento (nome comum)	Identificação dos isolados na coleção Embrapa-Trigo
Passo Fundo/RS	1	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.085
Três de Maio/RS	1	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.125
Vacaria/RS	1	<i>Digitaria sanguinalis</i> (milhã)	PY12.0.001
São Borja/RS	6	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.193; PY12.1.194; PY12.1.206; PY12.1.208; PY12.1.209; PY12.1.210
São Luiz Gonzaga/RS	7	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.181; PY12.1.182; PY12.1.188; PY12.1.191; PY12.1.195; PY12.1.196; PY12.1.201
Rolândia/PR	1	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.298
		<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.326; PY12.1.327; PY12.1.328; PY12.1.329; PY12.1.330; PY12.1.331; PY12.1.333; PY12.1.334; PY12.1.337; PY12.1.002i; PY12.1.017i; PY12.1.029i
		<i>Lolium multiflorum</i> (azevém)	PY12.0.055
		<i>Bracharia</i> spp. (braquiária)	PY12.0.038i
Londrina/PR	23	<i>Chloris</i> spp (capim de rhodes)	PY12.0.705

	<i>Sorghum sudanense</i> (capim-sudão)		PY12.0.023i
	<i>Eragrostis plana</i> (capim-anoni)		PY12.0.046i
	<i>Rhynchelytrum repens</i> (capim-favorito)		PY12.0.051i
	<i>Eleusine indica</i> (capim pé de galinha)		PY12.0.056i
	<i>Elionurus candidus</i> (capim-amargoso)		PY12.0.543i
	<i>Cynodon</i> spp. (tifton)		PY12.0.578i
	<i>Avena sativa</i> (aveia)		PY12.0.594i
	<i>Cenchrus echinatus</i> (capim-carrapicho)		PY12.0.642i
Itaí/SP		9	PY12.1.035i; PY12.1.039i; PY12.1.041i; PY12.1.046i; PY12.1.047i; PY12.1.048i; PY12.1.052i; PY12.1.053i; PY12.1.057i
Brasília/DF		11	PY12.1.109; PY12.1.110; PY12.1.112; PY12.1.113; PY12.1.114; PY12.1.115; PY12.1.116; PY12.1.117; PY12.1.119; PY12.1.154; PY12.1.161
Dourados/MS		1	12.1.183
Amambaí/MS		15	PY12.1.128; PY12.1.130; PY12.1.132; PY12.1.158; PY12.1.167; PY12.1.168; PY12.1.170; PY12.1.212; PY12.1.247; PY12.1.248; PY12.1.249
	<i>Chloris</i> spp. (capim de rhodes)		PY12.0.016
	<i>Avena sativa</i> (aveia)		PY12.0.070
	<i>Echinochloa</i> spp. (capim-arroz)		PY12.0.172

		<i>Brachiaria</i> spp. (braquiária)	PY12.0.146
		<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.182; PY12.1.257; PY12.1.260; PY12.1.261; PY12.1.262; PY12.1.267; PY12.1.317; PY12.1.318; PY12.1.319; PY12.1.320; PY12.1.321; PY12.1.323; PY12.1.358
Aral	15	<i>Cenchrus echinatus</i> (capim-carrapicho)	PY12.0.324
Moreira/MS		<i>Panicum maximum</i> (capim-colonião)	PY12.0.222
		<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.077; PY12.1.101; PY12.1.103
Perdizes/MG	4	<i>Cyperus rotundus</i> (tiririca)	PY12.0.008
		<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.002; PY12.1.011; PY12.1.014; PY12.1.020; PY12.1.034; PY12.1.035
Patrocínio/MG	6	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	PY12.1.026; PY12.1.038; PY12.1.041; PY12.1.042; PY12.1.043; PY12.1.044; PY12.1.045; PY12.1.046; PY12.1.047; PY12.1.054; PY12.1.058; PY12.1.059; PY12.1.060; PY12.1.061; PY12.1.062; PY12.1.068; PY12.1.106; PY12.1.111
Rio Verde/GO	19	<i>Digitaria sanguinalis</i> (milhã)	PY12.0.009

2.2 Isolados referência de *Magnaporthe oryzae*

Os dois isolados de *Magnaporthe oryzae*, com idiomorfos conhecidos, utilizados para o pareamento e caracterização sexual dos isolados da coleção da Embrapa Trigo, foram os isolados KA 3 e GUY 11. O primeiro, MAT 1-1, originário da Uganda e obtido da planta *Eleusine coracana* (capim-pé-de-galinha-gigante), e hermafrodita; e o segundo, MAT 1-2, da Guiana Francesa e obtido da planta *Oryza sativa* (arroz), e fêmea fértil (SILUE & NOTTEGHEM, 1990). Ambos foram cedidos da Coleção de Microrganismos e Fungos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão, estando conservados em papel filtro em temperatura de -20 °C.

2.3 Identificação dos idiomorfos, da sexualidade, da fertilidade e da presença de estruturas sexuais de isolados de *Magnaporthe oryzae*

A identificação da presença do gene MAT1-1 ou MAT1-2 foi realizada pelo método de pareamento dos três pontos (ITOI et al., 1983) com algumas modificações. Primeiramente, segmentos de papel filtro contendo o fungo dos isolados conservados foram transferidos para placas de Petri com meio de aveia (60 g de farinha de aveia, 12 g de ágar, 1 L água destilada), e incubados 15 dias em câmara para crescimento em temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, para posterior repicagem.

Prosseguiu-se com a repicagem em meio de farinha de arroz (50 g de arroz, 15 g de ágar, 20 g de dextrose, 1 L de água destilada) autoclavado e vertido em placa de Petri, o micélio dos isolados (dois isolados referência e isolado a ser estudado) em três pontos equidistantes 1 cm (Figura 1A), formando um triângulo. As placas foram vedadas com parafilme e transferidas para câmara incubadora refrigerada (BOD), marca Eletrolab[®] (modelo EL212), com temperatura de 25 °C e escuro nos dois primeiros dias, em seguida foram expostas à luz contínua por 21 dias e temperatura de 20 °C. Em sequência, com a visualização dos peritécios na região de encontro das colônias avaliou-se a sexualidade de acordo com a escala descrita por Notteghem e Silué (1992), denominando-se os isolados como macho (M – formação de uma banda de peritécios ao lado oposto ao isolado teste), fêmea (F – formação de uma banda de peritécios do mesmo lado do isolado teste) ou hermafrodita (H – formação de duas bandas de peritécios). Para fertilidade, contou-se o número de peritécios formados em 1 cm² (Figura 1B), e classificou-se em: alta fertilidade - AF (> 20 peritécios), média fertilidade - MF (10-19 peritécios), baixa fertilidade - BF (< 10 peritécios), e infértil - I (sem formação de peritécio) (CONSOLO et al., 2005). Ainda, retiraram-se os peritécios (P) do meio de cultura e investigou-se a presença de ascas (A) e ascósporos (ASC) com o preparo de lâminas com água destilada e lamínula. Todos os pareamentos foram realizados em duas placas de Petri e em duplicata.

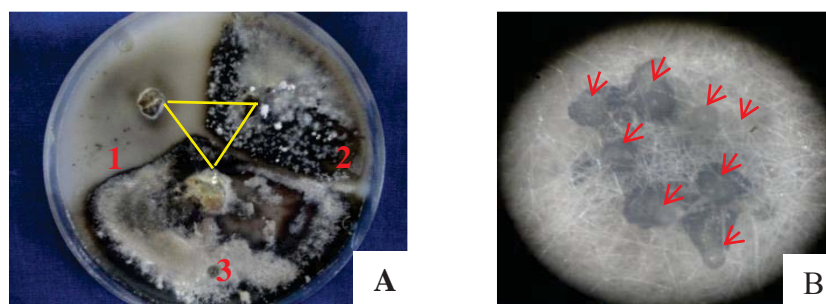


Figura 1. Pareamento dos isolados pelo método de repicagem dos três pontos (A), isolado referência KA 3 (1), isolado referência GUY 11 (2), isolado teste (3); peritécios/cm² (B). Passo Fundo-RS, 2016

2.4 Inoculação de isolados de *Magnaporthe oryzae* em plântulas de trigo

Foram feitas suspensões com esporos de dois isolados de *M. oryzae* e utilizadas em procedimentos de inoculação de plântulas da cultivar BR 24. A composição das suspensões dos pares de isolados foi equitativa, ou seja, cada suspensão foi composta por 50% dos esporos de cada isolado, sendo composta por esporos de um isolado de trigo e por um isolado de poácea invasora. Os isolados utilizados foram dois isolados de trigo (identificados como MAT1-1 e outro como MAT 1-2), e 20 isolados de plantas invasoras (11 deles identificados como MAT1-1 e nove como MAT1-2). Mantidos em papel-filtro, foram transferidos para o meio de aveia em placas de Petri, para o crescimento em câmara com temperatura de 25 °C por 15 dias e fotoperíodo de 12 h. A obtenção da suspensão de inóculo se deu pela raspagem das placas de Petri contendo as colônias dos isolados, com o auxílio de um pincel, água destilada e Tween 80 (1 gota L⁻¹). A contagem dos

conídios da suspensão foi realizada em câmara de Neubauer (Loptik Labor 0,0025 mm²) e microscópio ótico (Nikon Eclipse E 200), e a concentração foi ajustada para 100.000 esporos mL⁻¹.

Para cada um dos 22 isolados crescidos, obteve-se uma suspensão de conídios, os quais foram inoculados em conjunto de acordo com a compatibilidade alélica do gene MAT (Tabela 2), em plântulas de trigo da cultivar BR 24, quando da presença de 3 a 4 folhas verdadeiras, estágio 14 da escala de Zadoks et al. (1974). Utilizou-se um atomizador manual, e para cada conjunto de isolado, foram inoculados dois copos plásticos com 5 plântulas cada (Figura 2A e 2B), os quais após a inoculação foram envolvidos por sacos plásticos separadamente, e mantidos em câmara úmida por 24 horas, na ausência da luz e em temperatura de 26 °C.

Decorrido o período de 24 h, os sacos plásticos foram removidos, o fotoperíodo foi alterado para 12 h, e acionou-se o regime de nebulização hídrica de 60 s ligada e 1800 s desligada. Após 30 dias da inoculação fez-se: o reisolamento das lesões foliares características de brusone; a cultura de 10 monospóricos de cada conjunto inoculado; e avaliou-se a presença de estruturas sexuais nas folhas, mais especificamente abaixo da epiderme, com auxílio de lupa eletrônica.

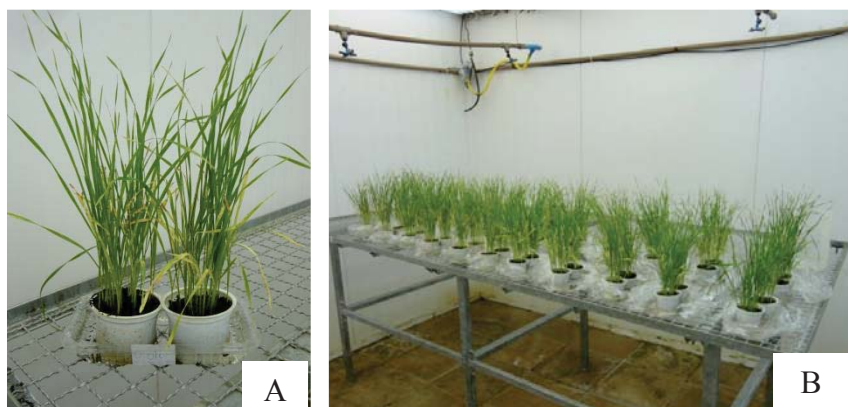


Figura 2. Plântulas de trigo inoculadas com diferentes combinações de isolados. Dois copos para cada combinação de isolado (A), 20 combinações de isolados (B). Passo Fundo-RS, 2016

2.5 Reisolamento das lesões de *Magnaporthe oryzae*

As folhas das plântulas com lesões características de brusone, após decorrido os 30 dias da inoculação, foram coletadas e levadas para o laboratório. Foram selecionados segmentos próximos às regiões das lesões, e fez-se a assepsia com hipoclorito de sódio e água na proporção 1:1, em um becker, pelo tempo de um minuto. Com auxílio de uma peneira e uma pinça, transferiu-se o material vegetal para placas de Petri com o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), conforme protocolo descrito por Fernandez (1993). As placas foram incubadas a 25 °C em câmara climatizada com fotoperíodo de 12 horas por 4 dias, para estimular a esporulação do patógeno sobre o tecido vegetal sintomático.

Após a esporulação, os conídios e conidióforos foram observados em microscópio-estereoscópico, e cada pedaço vegetal contendo a esporulação do patógeno foi

transferido do meio de cultura para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água esterilizada, agitou-se em vórtex por um minuto, e verteu-se a suspensão em uma placa de Petri com o meio ágar-água (FERNANDEZ, 1993). Para a ocorrência da germinação do esporo sobre o meio, a placa foi mantida por aproximadamente 4 h em câmara de crescimento a 25 °C.

A observação do tubo germinativo dos esporos foi realizada após 4 h com auxílio de microscópio estereoscópico, e com uma agulha histológica, transferiu-se um esporo do meio ágar-água para uma placa de Petri com o meio de aveia. Esse procedimento foi realizado para 10 esporos de cada conjunto de inoculação, totalizando 200 isolados monospóricos que identificam os isolados recuperados, denominados de reisolados (Tabela 2).

As placas com os isolados monospóricos foram deixadas em câmara de crescimento por 15 dias, em fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C. Com a colonização de toda placa de Petri, realizou-se a raspagem do micélio do fungo, acondicionando em um tubo *Eppendorf*[®] de 2 mL contendo três esferas metálicas de 2,3 mm de diâmetro, e em temperatura de -80 °C, até a etapa seguinte de extração de DNA.

Tabela 2 - Conjunto de isolados parentais de *Magnaporthe oryzae* de acordo com a compatibilidade sexual, e a identificação dos isolados recuperados. Passo Fundo–RS, 2016

Isolado de trigo (MAT1-1) X Isolado de planta invasora (MAT1-2)	Identificação do conjunto dos 10 isolados recuperados	Isolado de trigo (MAT1-2) X Isolado de planta invasora (MAT1-1)	Identificação do conjunto dos 10 isolados recuperados
PY12.1.260 X PY12.0.009	A1...A10	PY12.1.183 X PY 12.0.008	J1...J10
PY12.1.260 X PY12.0.016	B1...B10	PY12.1.183 X PY 12.0.023i	K1...K10
PY12.1.260 X PY12.0.070	C1...C10	PY 12.1.183 X PY 12.0.324	L1...L10
PY12.1.260 X PY12.0.578i	D1...D10	PY 12.1.183 X PY 12.0.705	M1...M10
PY12.1.260 X PY12.0.046i	E1...E10	PY 12.1.183 X PY 12.0.642i	N1...N10
PY12.1.260 X PY12.0.001	F1...F10	PY 12.1.183 X PY 12.0.146	O1...O10
PY12.1.260 X PY12.0.543i	G1...G10	PY 12.1.183 X PY 12.0.594i	P1...P10
PY12.1.260 X PY12.0.056i	H1...H10	PY 12.1.183 X PY 12.0.222	Q1...Q10
PY12.1.260 X PY12.0.055	I1...I10	PY 12.1.183 X PY 12.0.038i	R1...R10
-	-	PY 12.1.183 X PY 12.0.172	S1...S10
-	-	PY 12.1.183 X PY 12.0.051i	T1...T10

2.6 Extração e quantificação do DNA de isolados de *Magnaporthe oryzae*

A extração de DNA dos isolados parentais e dos isolados recuperados foi realizada seguindo o protocolo proposto por Bonato et al. (2014), conforme as seguintes etapas, resumidamente:

- a) Os isolados acondicionados nos tubos *Eppendorf*[®] foram retirados do ultra freezer e dispostos em um bloco de aço congelado em nitrogênio líquido, para a maceração mecânica no equipamento *Mini-BeadBeater*[®] por 2 minutos;
- b) Adicionou-se 1000 µL de tampão de extração e incubou-se em banho-maria (65 °C a 70 °C) por 30 minutos, seguindo com a adição de outros reagentes e processos de centrifugação e incubação, até a formação do *pellet* (grumo) de DNA, e sua secagem em temperatura ambiente no *Speedvac Concentrator*[®] por 15 minutos;
- c) Pipetou-se 200 µL de solução de TE 10-1 mM com 1 µL de RNase para cada amostra, seguiu-se com o banho-maria (37 °C) por 30 minutos e acondicionamento dos tubos a 4 °C (geladeira) até a etapa de quantificação do DNA;
- d) Para a quantificação do DNA extraído, utilizou-se gel de agarose a 0,8% (2g agarose; 25 mL TBE 1X; 225 mL água destilada; 5 µL de brometo de etídio);
- e) Após a solidificação do gel, pipetou-se nas canaletas o marcador de quantificação Lambda 25 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng e cada amostra de DNA (4 µL do DNA com 12 µL de *stop solution*);
- f) Foi realizada a eletroforese utilizada na *PowerPac*[™] *Basic Power Supply* (Biorad[™]) e os parâmetros foram 120 V por 1 hora. A fotodocumentação em raio ultra violeta foi realizada no equipamento *ChemiDoc*[™] *XRS+*

System (Biorad™) com a capturação da imagem pelo programa *GelDoc XR™*;

- g) Finalizou-se, com a quantificação visual da concentração do DNA, observando a intensidade de coloração das bandas nos géis, e assim fez-se o ajuste do DNA para uma concentração de 25 ng. L⁻¹ para posterior reação em cadeia da polimerase (PCR);
- h) A quantificação fluorométrica dos microvolumes dos DNA também foi realizada com o equipamento Quant-iT™ (BioTek®) e o reagente *Picogreen*®.

2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e marcadores microssatélites (SSR)

As reações de amplificações dos DNAs foram realizadas utilizando-se 24 marcadores (*primers*) do tipo microssatélite desenvolvidos por Pereira et al. (2014), (Tabela 3), marcados pelos fluoróforos: amarelo (NED), vermelho (PET), verde (VIC) ou azul (FAM) e com diferentes programas de termociclagem. Para cada SSR foi utilizado uma placa de PCR, distribuindo-se em cada poço 5 µL de DNA e 5 µL de mix dos reagentes C ou D (Tabela 4), totalizando um volume final de reação de 10 µL. A placa foi vedada e colocada no equipamento *GeneAmp PCR System 9700* marca *Applied Biosystems*®, e finalizado o tempo no termociclador, procedeu-se com a pipetagem de água ultra pura (Milli-Q®) nas placas, de acordo com a necessidade de diluição de cada marcador/fluoróforo. Após, as placas foram acondicionadas em geladeira, até a etapa de multiplex e genotipagem por eletroforese capilar.

Tabela 3 – Características dos 24 dos marcadores SSR para os isolados de *Magnaporthe oryzae*. Passo Fundo-RS, 2016

Identificação (ID)	Marcador (SSR)	Sequência Senso	Sequência Anti-senso	Fluoróforo	Programa termociclagem	Mix
P1	cnpt_mg_c013tri	CACCTGCCCCACAGGATTTT	AAATTGTATGCCAAGGTGGAAC	NED	58 °C	C
P2	cnpt_mg_c041	TAGCCCTCTCTCCCTCTCTCT	CGGTGGTAGAACTTTCGTGTGT	PET	58 °C	C
P3	cnpt_mg_c047	AGGTTGGTGACGACGAAAAC	CATTGTACGCCACATAGCTT	VIC	58 °C	C
P4	cnpt_mg_c049	CCTGTTCTTCTCGCTATTGTCC	TATCATCTCTGAAATCGACAGCA	FAM	TD 60-56 °C	C
P5	cnpt_mg_c108	CTCCGAATGACTCTGCCAAT	TTGGGATGAAACCCTCGATATAC	NED	60 °C	D
P6	cnpt_mg_c068	ATGAACGACATGGACTCGAATA	GAATCCTCTCCAATGCAACTTC	PET	58 °C	C
P7	cnpt_mg_c077	GTACCTAGAAAATGCACGTCGG	CCGTTCC TTGAGTGTC TGTTTT	VIC	58 °C	C
P8	cnpt_mg_c091	AACACTAAGGGGTCGGCTTT	AGTCAATCCCATCACTGGTC	FAM	58 °C	C
P9	cnpt_mg_c160	GTTGGCGTAAAGAACTCTGTGAA	GAGGTGTCTGGAAGAATTG	NED	TD 60-56 °C	D
P10	cnpt_mg_c129	CCGGAGAAAAGGTATTTTAGGG	GATCACATCTACAAGCGAAAACCT	PET	58 °C	C
P11	cnpt_mgplb3	CAAACATCACTGGCTGCG	GCATCAACACCAGAAAAGGAGA	VIC	58 °C	C
P12	cnpt_mg_c168	CGTATGCGAGTGACAGAAGAAA	TCCTGGCGGAGATATAAAGA	FAM	58 °C	C
P13	cnpt_mg_c211	GATCACGCGAGGGGAGCAT	GTTGCCCTCTGAGTCTTGACCCCTT	NED	58 °C	C
P14	cnpt_mgpl1e10	AGGCTAAAGAGGGGTGTTGGGT	GCATTGAGCATACAGGGTTG	PET	TD 60-56 °C	C
P15	cnpt_mg_c248	GCGGAATCTTTTATCCTGA	AAGTCCCATATTGCTTTGAC	VIC	58 °C	C
P16	cnpt_mg_c065	ACCTCCAGCACTAATACTCCCA	AAAAGCACACATACAGACGCC	FAM	58 °C	C
P17	cnpt_mgplb8	CAACTGCGAAITCTCTCCACA	CGGGTACAACGTAATTTGGG	NED	TD 60-56 °C	C
P18	cnpt_mgpl1e7	CTGTCTCCCGGCTTACACA	TAACAGGTTGAATGCCCGA	PET	58 °C	C
P19	cnpt_mg_c019	AGAGCATGTCGGTTAGGATAGG	TGGAATCATCATCAGGTCAAG	VIC	TD 60-56 °C	C
P20	cnpt_mgpl1e11	AACAAATCAAAGGGCTCAACG	AAATAACCGGAGTGGTGCAT	FAM	58 °C	C
P21	cnpt_mg_c147	ACTTTGGTGGAGTCACTGTCCT	AGGAACCCACGCTAAAATCAGAG	NED	58 °C	C
P22	cnpt_mg_c059	CITTTGGCTGTTGTTACCCACT	AGCCTATTGTGATTTTGGTCGT	PET	58 °C	C
P23	cnpt_mg_c060	CCGGTTGGCTTTCGTCAT	GTCCAAAAGTGCCCTGACTATC	VIC	58 °C	C
P24	cnpt_mg_053	CGAGACACGTTCAATCAATCA	ATATGGAGATTGGTGGGGTTT	FAM	58 °C	C

Tabela 4 – Reagentes e concentrações para a técnica de PCR.
Passo Fundo-RS, 2016

Componente	Mix C		Mix D	
	Concentração na reação	Volume por reação	Concentração na reação	Volume por reação
Água Milli-Q®		1,70 µL		1,05 µL
Tampão PCR	1x	1,0 µL	1x	1,0 µL
MgCl ₂	2,5 mM	1,0 µL	2,5 mM	1,0 µL
Nucleotídeos ¹	0,2 mM	0,8 µL	0,35 mM	1,40 µL
<i>Primer Reverse</i>	0,2 mM	0,20 µL	0,2 mM	0,20 µL
<i>Primer Forward</i> ²	0,02 mM		0,02 mM	
Fluoróforo ³	0,2 mM	0,20 µL	0,2 mM	0,20 µL
Taq Polimerase	0,5 U	0,10 µL	0,75 U	0,15 µL
Total Mix		5 µL		5 µL

¹Concentração de cada nucleotídeo (A, T, C, e G); ²Sequência inicial do marcador, com cauda igual aos fluoróforos; ³Marcador M13 para fluorescência (NED, PET, VIC ou FAM)

2.8 Eletroforese Capilar

A eletroforese no sequenciador automático, necessitou do preparo das placas com as reações de PCR, em multiplex, ou seja, as placas com as reações foram separadas em seis conjuntos de quatro placas, contendo uma mistura de marcadores com os quatro fluoróforos NED, PET, VIC e FAM.

Para cada conjunto de placas, ou seja, quatro marcadores realizaram-se as seguintes etapas:

1. Pipetou-se 3 µL de cada poço da placa com a reação de PCR para uma nova placa, totalizando 12 µL em cada poço, e misturou-se;
2. Destes 12 µL, retirou-se uma alíquota de 3 µL que foi dispensada em outra placa contendo um volume de água ultra pura, variável de acordo com a necessidade de cada

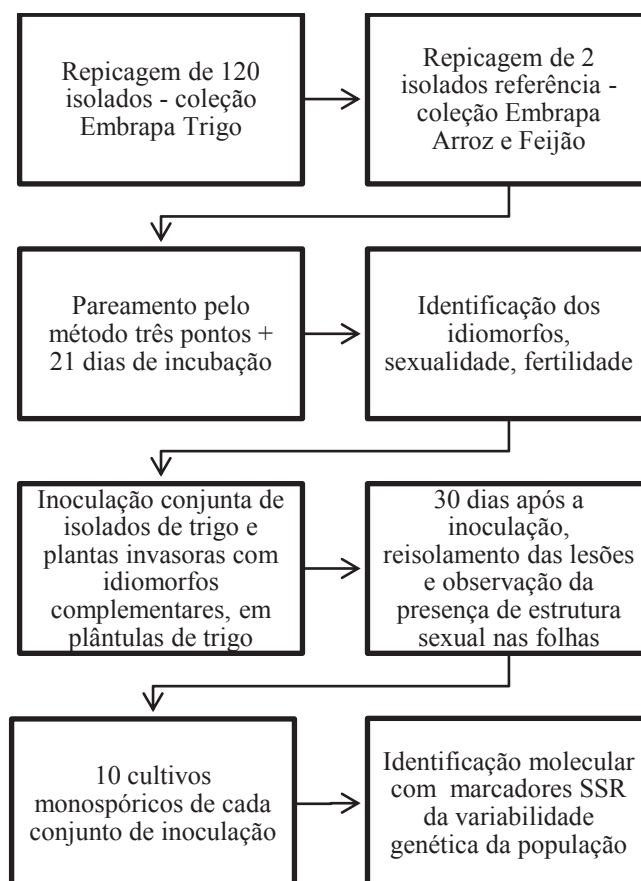
conjunto de quatro marcadores, para não ocorrer saturação do sinal no sequenciador, e ser possível observar todos os fluoróforos;

3. Misturou-se e retirou-se 3 μL , que foi pipetado em outra placa contendo 7 μL da solução do marcador de peso molecular Liz 500: formamida (10 μL : 660 μL);
4. A placa foi vedada e inserida no sequenciador automático *ABI3130XL*, marca *Applied Biosystems*[®], programou-se a eletroforese, e procedeu-se de acordo com as recomendações do fabricante;
5. Aproximadamente 12 horas após, com os eletroferogramas gerados, foram analisados os fragmentos gerados.

2.9 Análise estatística

A análise dos fragmentos gerados nos eletroferogramas, foi realizada no programa *GENEMAPPER*[®] *ID* – Versão 3.7. Transformou-se os dados em uma matriz binária, atribuindo-se 1 para presença e 0 para a ausência da amplificação dos fragmentos de DNA. Os dados binários foram analisados usando-se o programa *GENES*[®] (VS 2013 5.1) pelo coeficiente de similaridade (CS) de Jaccard. Para a construção dos dendrogramas, foi utilizado o agrupamento UPGMA (ligação média entre grupo).

2.10 Fluxograma do trabalho



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação e caracterização sexual de idiomorfos de *Magnaporthe oryzae*

Dos 120 isolados amostrados de diferentes estados produtores de trigo do Brasil, 85,84% da população apresentou o idiomorfo MAT1-1, e 14,16% o idiomorfo do tipo MAT1-2. As

relações dos idiomorfos MAT1-1 para MAT1-2, de acordo com o estado de origem dos isolados (Figuras 4 e 5) foram de: 13:3 (Rio Grande do Sul - RS), 18:6 (Paraná - PR), 9:0 (São Paulo - SP), 10:1 (Distrito Federal - DF), 27:4 (Mato Grosso do Sul - MS), 10:0 (Minas Gerais - MG), e 17:2 (Goiás - GO). A presença de isolados com compatibilidade alélica em uma mesma região é a primeira evidência da importância da reprodução sexual na variabilidade, pois em condições ambientais específicas pode ocorrer cruzamento sexual na natureza (BRUNO & URASHIMA, 2001). No entanto, estudos realizados com o fitopatógeno *Stagonospora nodorum*, mostraram que o desequilíbrio entre os dois tipos de idiomorfos, desfavorece a existência espontânea do teleomorfo, e sua ocorrência passa a ser inferior a uma vez ao ano (SOMMERHALDER et al., 2006).

Maciel et al. (2014), estudando populações de *M. oryzae* do trigo de diversas regiões do Brasil com auxílio de marcadores microssatélites, encontraram os dois tipos compatíveis para os estados de DF, MG, GO e PR. E, isolados obtidos de lavouras de trigo do estado de SP apresentaram 100% do idiomorfo MAT1-1. No mesmo trabalho, subpopulações de isolados do patógeno dentro de cada estado, apresentaram-se como uma população clonal MAT1-1, com isso, supondo-se que a estrutura populacional de *M. oryzae* que infecta o trigo, está formada a partir de um sistema misto de reprodução, com epidemias de brusone iniciadas pela dispersão a longas distâncias de ascósporos, e aumento local da população pela reprodução assexuada. Maciel et al. (2014) também

afirmaram que, nos estados de SP e MG, onde foram encontrados somente o idiomorfo MAT1-1, a população clonal já se estabeleceu e que possivelmente os indivíduos variantes que venham a ocorrer serão em decorrência de algum outro mecanismo de variabilidade, como as mutações. O estabelecimento de uma população patogênica com um único idiomorfo, é em decorrência de alguma vantagem competitiva da forma compatível predominante (SALEH et al., 2012), e seu aumento na população original, pode levar ao isolamento reprodutivo formando uma barreira à especiação.

Dos 16 isolados com idiomorfo identificado como MAT1-2, apenas 7 foram obtidos de trigo, e os demais, foram obtidos de plantas invasoras (Figuras 3 e 4), quais sejam: *Digitaria sanguinalis*, *Lolium multiflorum*, *Eragrostis plana*, *Eleusine indica*, *Elionurus candidus*, *Cynodon* spp., *Chloris* spp., *Avena sativa* e *Cenchrus echinatus*. Este resultado confere a essas espécies de plantas, na condição de invasoras da cultura do trigo, o potencial de exercer influência na geração da variabilidade de *M. oryzae* do trigo. Significa que, a probabilidade de ocorrer compatibilidade alélica e presença de reprodução sexuada, é maior entre isolados de trigo com plantas invasoras, do que isolados de trigo com trigo. Uma situação diferente pode ser atribuída a *M. oryzae* do arroz, no Brasil, em que existe a predomínio do idiomorfo MAT1-2, conforme os dados apresentados por Peixoto (2014), que demonstraram que todos 208 isolados avaliados pertenciam a esse idiomorfo, embora alguns outros trabalhos anteriores relatem a prevalência do idiomorfo MAT1-1 (KATO & YAMAGUCHI, 1982;

YAEGASHI & YAMADA, 1986; NOTTEGHEM & SILUÉ, 1992).

Os dois isolados obtidos de *D. sanguinalis* utilizados nos experimentos do presente trabalho, foram classificados como idiomorfo MAT1-2. Esta situação, difere de resultados obtidos em outros trabalhos, pois Takan et al. (2012), encontraram os dois idiomorfos entre os isolados obtidos de plantas desse gênero, e Bruno & Urashima (2001), encontraram somente o idiomorfo MAT1-1 para isolados da espécie *Digitaria horizontalis*. Resultados positivos, quanto ao cruzamento *in vitro* entre isolados de *M. oryzae* do trigo e de *D. horizontalis*, *Setaria geniculata* e *Brachiaria plantaginea*, foram obtidos por Bruno & Urashima (2001), e também por Galbieri & Urashima (2008), em cruzamentos *in vitro*, entre isolados de *M. oryzae* do trigo e obtidos de *B. plantaginea*, *Bromus catharticus*, *Phalaris canariensis* e *x Triticosecale* Wittmack. Estes dados reforçam a expectativa de uma relação positiva entre variabilidade de *M. oryzae* do trigo, e a presença de plantas invasoras nos campos de trigo que hospedam o patógeno.

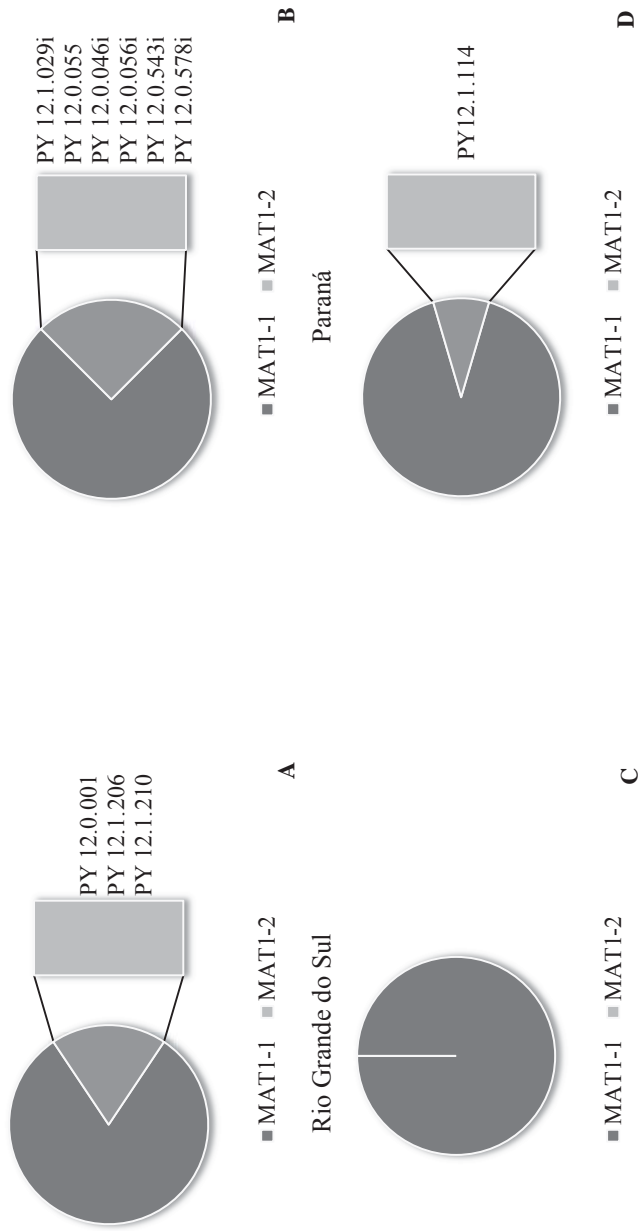


Figura 3. Idiormorfos de *Magnaporthe oryzae* em quatro estados brasileiros. Passo Fundo-RS, 2016

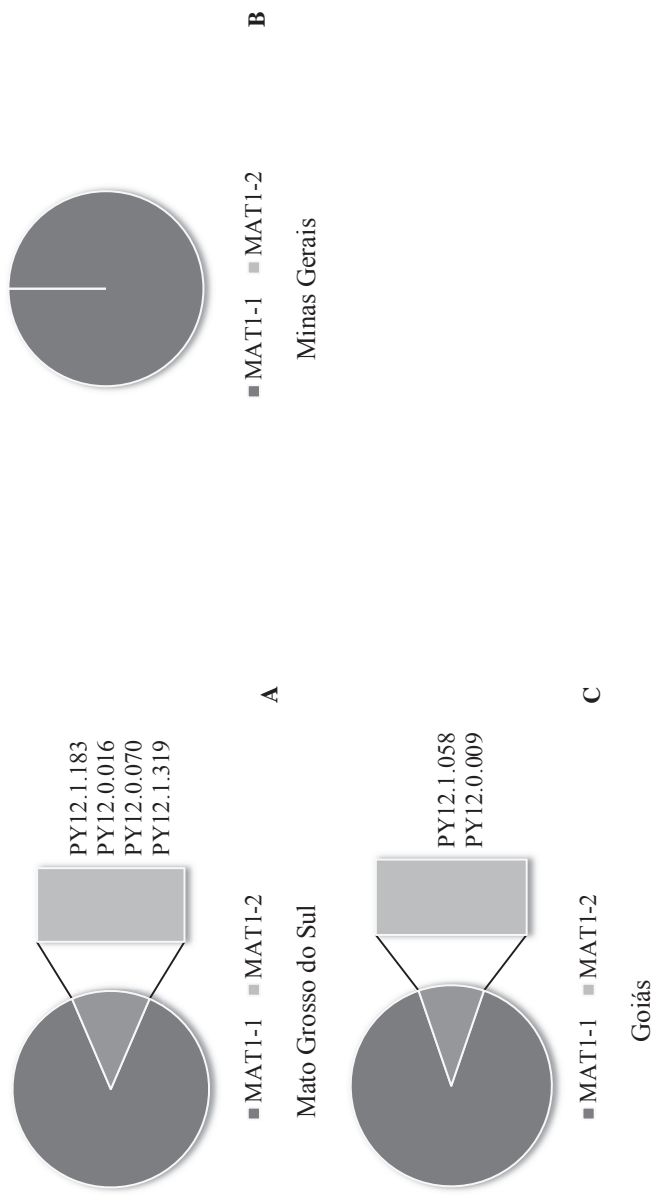


Figura 4. Idiormorfos de *Magnaporthe oryzae* em três estados brasileiros. Passo Fundo-RS, 2016

Quanto à fertilidade, apenas dois isolados apresentaram média fertilidade, PY12.1.183 e PY12.1.319, ambos do estado do MS e obtidos de trigo, o restante da população foi classificada como de baixa fertilidade. Bruno & Urashima (2001), também encontraram a maior fertilidade, para os isolados do MS, mas diferentes graus de fertilidade para os isolados do PR. Isso confirma que ocorre variabilidade numa mesma região geográfica. A baixa fertilidade dos isolados de uma população, quando testada em laboratório, pode simplesmente refletir numa pequena probabilidade de se encontrar indivíduos férteis ou incompatibilidade com o isolado testador, não descarta a ocorrência de reprodução sexuada (MCKWATANAKARN & PHROMRAKSA, 1999). A importância do isolado testador também foi reportado por Viji & Gnanamanickam (1998), sendo que isolados de *M. oryzae* de capim pé de galinha gigante (*Eleusine coracama*) quando expostos ao cruzamento com GUY-11 apresentaram apenas a formação de peritécios, e quando submetidos ao cruzamento com outros isolados testadores (KA-3, KA-7, KA-9), houve a presença de todos os órgãos sexuais.

Os isolados, PY12.1.183, PY12.1.260, e PY12.1.319, todos do hospedeiro trigo cultivado no estado do MS, foram os únicos que expressaram-se como fêmeas férteis com produção de todas as estruturas sexuais, que puderam ser visualizadas e caracterizadas fenotipicamente conforme descrição de Purchio-Muchovej & Muchovej (1994): peritécios negros e globosos (Figura 5A e 5B), distribuídos em grupo, com rostro que emerge sobre o meio de cultura, ascas unitunicadas e

hialinas (Figura 5C), que facilmente sofrem deliquescência e liberam os ascósporos hialinos, tri-septados e fusiformes (Figura 5D).

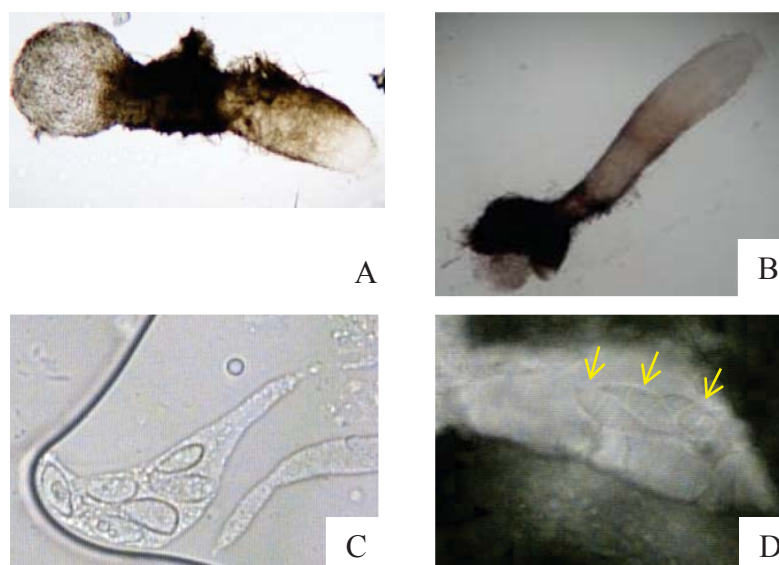


Figura 5. Estruturas reprodutivas sexuadas de *Magnaporthe oryzae*. Peritécio recém-formado (A) e maduro (B); Asca com ascósporos (C); Ascósporos tri-septados (D). Passo Fundo-RS, 2016

A maioria dos isolados estudados, tanto de trigo, quanto de plantas invasoras, não apresentaram a formação de ascas e ascósporos. Isso também já foi encontrado em isolados de arroz do Brasil, e documentado por Urashima et al. (1993) e Peixoto (2014). Entretanto, os isolados de *M. oryzae* do trigo do Brasil são caracterizados, em sua maioria, como fêmea e hermafrodita, de alta fertilidade e abundante produção de peritécio (BRUNO & URASHIMA, 2001), diferentemente dos isolados do arroz, que se caracterizam por serem machos (fêmeas estéreis) (ITOI et al., 1983; NOTTEGHEN & SILUÉ,

1992). Testes de cruzamento *in vitro* com isolados de *M. oryzae* do arroz mostraram que, apesar da metade da população estudada ter produzido peritécios com ascas e ascósporos, a viabilidade dos ascósporos não foi superior a 5% (NOTTEGHEN & SILUÉ, 1992). Isso compromete negativamente a sua germinação e, conseqüentemente, o crescimento vegetativo e a formação dos novos indivíduos, limitando a variabilidade pelo mecanismo reprodutivo sexual.

Sabe-se que a regulação do reconhecimento do tipo sexual ocorre não somente pelo gene MAT, mas também pela expressão de outros genes, cuja interação desencadeia uma transdução com liberação de feromônios e outros estímulos, e a partir de então se inicia uma rota de sinalização celular que envia sinais ao núcleo (SHEN et al, 1999). Ainda, Ueyama & Tsuda (1975), sugeriram que nos fungos imperfeitos que há falta de uma fase perfeita, as causas seriam as seguintes: (a) a deficiência inerente (gene deficiência); (b) o isolamento em função do tipo de acasalamento (por exemplo, isolamento geográfico); e (c) as condições ambientais inadequadas.

Sendo assim, há possibilidade do pequeno número de indivíduos férteis observados neste trabalho, terem sido às condições ambientais de indução para ocorrência do ciclo sexual. O ambiente para indução *in vitro* da formação das estruturas sexuais é heterogêneo entre os isolados de *M. oryzae* (MOREIRA et al., 2015), e um simples atraso dos cromossomos durante as divisões nucleares no momento da formação das ascas, pode resultar em peritécios estéreis (CONSOLO et al., 2005).

Estudos mostraram que a expressão do gene MF1-1 na espécie *Cryphonectria parasítica*, variou em função da composição do substrato e da idade do isolado (TURINA et al., 2003). Isolados de *M. oryzae* submetidos à deleção do gene indutor das proteínas-G (MGG1), quando cruzados com isolados testes selvagem, produziu poucos peritécios, com ascas vazias ou com número reduzido de ascósporos (LI et al., 2015), e mutantes para os genes envolvidos na biossíntese de arginina (MoArg1, MoArg5,6, e MoArg7), só produziram peritécios em meio suplementado com o aminoácido em questão (ZHANG et al., 2015).

Ainda quanto à sexualidade, verificou-se que os isolados machos (fêmea estéril) representaram 92,5% da população estudada, os isolados hermafroditas 4,16%, e os isolados fêmeas (fêmeas férteis) 3,33%. O hermafroditismo foi encontrado somente entre os isolados obtidos de espécies de plantas invasoras, PY12.0.001 (RS), PY12.0.038i (PR), PY12.0.016 (MS), PY12.0.146 (MS), PY12.0.008 (MG), e dentre esses, estão ambos os isolados estudados de *Brachiaria* spp. Para Urashima et al. (1993), 100% dos isolados de *Brachiaria plantaginea* investigados apresentaram sexualidade hermafrodita, e isso implica em cruzamentos mais férteis (ITOI, 1983), inclusive com isolados de outras espécies hospedeiras do patógeno, aumentando a variabilidade (BRUNO & URASHIMA, 2001). Possuir a característica sexual de fêmea ou hermafrodita é condição requisito para que haja alta fertilidade e cruzamento sexual entre diferentes isolados de *M. oryzae* (BRUNO & URASHIMA, 2001). No entanto, Zeigler (1998)

documenta que o hermafroditismo é altamente complexo e instável, perdendo rapidamente a fertilidade.

Os isolados de *M. oryzae* foram identificados como macho, fêmea ou hermafrodita, esperando-se encontrar um padrão de resposta de acordo com o hospedeiro. Entretanto, o que se observou foi que estes caracteres divergiram dentro de uma mesma espécie hospedeira. A variabilidade intraespecífica foi encontrada em menor ocorrência para os isolados do hospedeiro trigo, e em maior, para os isolados das poáceas invasoras, como: *D. sanguinalis*, com o isolado PY12.0.001 (RS) sendo identificado como hermafrodita, e PY12.0.009 (GO), como macho; *C. echinatus*, com o isolado PY12.0.642i (PR), macho, e PY12.0.324 (MS), fêmea; e *Chloris* spp. com o isolado PY12.0.016 (MS), hermafrodita, e PY12.0.705 (PR), macho. Em trabalhos anteriores, Bruno & Urashima (2001), encontraram homogeneidade sexual para os isolados obtidos de *Digitaria horizontalis* coletados nos estados do PR e SP. E, Galbieri & Urashima (2008), observaram que isolados obtidos de *x triticosecale* Wittmack dos estados de SP e MS, variaram o comportamento sexual dentro da mesma espécie, independente do local de coleta. Dentro de uma população, estas pequenas variabilidades intrínsecas de cada indivíduo, são consideradas como o ponto de partida para o processo de seleção natural, e estão relacionadas às pressões seletivas impostas pelas condições geográficas locais (PRABHU et al., 1992). Assim, acredita-se que a diversidade encontrada para as características sexuais dos isolados obtidos das plantas invasoras, seja decorrente de um processo de adaptação do patógeno nestes

hospedeiros, que ainda está acontecendo. Diferentemente do hospedeiro trigo, que apresenta uma população estabilizada.

3.2 Variabilidade genética de isolados de *Magnaporthe oryzae* do trigo e de outros hospedeiros

Na análise da variabilidade genética dos isolados de *M. oryzae*, encontrou-se um coeficiente de similaridade (CS) de 0,92 entre os dois isolados obtidos de trigo (PY12.1.260 e PY12.1.183) (Figura 6). Identificou-se a formação de cinco grupos (1,2,3,4, e 5), e no último grupo, por semelhança genética, agruparam-se os dois isolados obtidos do trigo, juntamente com os seguintes isolados obtidos de poáceas invasoras: PY12.0.056i (*Eleusine indica*), PY12.0.051i (*Rhynchelytrum repens*), PY12.0.642i (*Cenchrus echinatus*), PY12.0.038 (*Brachiaria* spp.), PY12.0.023i (*Sorghum sudanense*), PY12.0.016 e PY12.0.705 (*Chloris* spp.), PY12.0.0172 (*Echinochloa repens*), PY12.0.543i (*Elionurus candidus*), e isolados obtidos de hospedeiros importantes principalmente para a alimentação animal, como *Avena sativa* (PY12.0.070), *Lolium multiflorum* (PY12.0.055) e *Cynodon* spp. (PY12.0.578i). Isso mostrou que, dos 22 isolados de *M. oryzae* estudados, 16 compartilham parte da informação genética, e assim contribui-se para a hipótese de que a origem da brusone do trigo, foi através de uma propagação clonal de uma linhagem epidêmica de *M. oryzae* de poáceas hospedeiras, seguida de especiação, dispersão e adaptação ao trigo (CERESINI et al., 2011; MACIEL et al., 2014). Essa relação de similaridade entre

os isolados de *M. oryzae* do trigo com os isolados de outros hospedeiros, também foi encontrada por Danelli (2015), em estudos de identificação de raças do patógeno. Urashima et al. (2007), avaliando a dispersão de esporos do patógeno, demonstrou que isolados que estavam a pelo menos 1 km de distância do foco da doença apresentaram fluxo de genes pelo fato de ter sido encontrado o mesmo perfil genético entre as populações, e a implicação direta da presença do fluxo gênico numa população é o favorecimento adaptativo do patógeno (AZEVEDO, 2008), o que dificulta o seu controle. As populações geralmente apresentam maior diversidade genética e alto fluxo gênico nos centros de origem da espécie, com o intuito de introduzir novos alelos e indivíduos geneticamente mais adaptados, e em arroz, populações clonais do patógeno altamente virulento, foram formadas a partir da troca de genótipos inteiros entre as populações (PRABHU & FILIPPI, 2006).

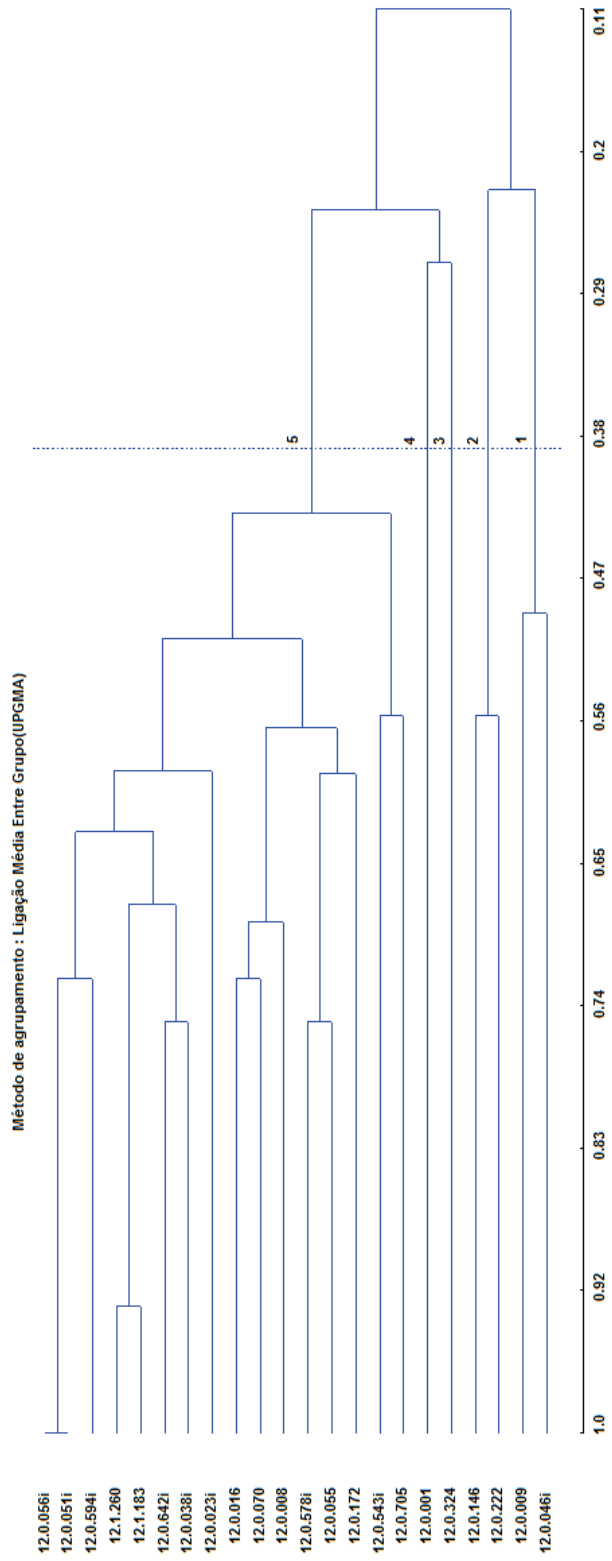


Figura 6. Dendrograma dos 20 isolados de *Magnaporthe oryzae* e dois isolados de *Magnaporthe grisea*. Passo Fundo-RS, 2016

Com a identificação de um CS de 0,63 entre os isolados obtidos do trigo (PY12.1.183) e do azevém (PY12.1.055), entendeu-se que o baixo polimorfismo entre os isolados das duas espécies hospedeiras, poderia favorecer a troca do hospedeiro. E isso ocorrendo, em regiões como dos Estados Unidos, onde há somente relatos de brusone no azevém, se teria uma nova doença comprometendo o cultivo do trigo. Viji & Uddin (2002), mostraram a ocorrência de três linhagens estreitamente relacionadas entre os isolados recuperados de azevém perene, entre os anos de 1995 e 1998, e desde então, análise da estrutura genética do patógeno e monitoramento da população de *M. oryzae* isoladas do azevém perene são realizadas.

Com um CS de 0,68, houve proximidade genética entre os isolados obtidos do trigo (PY12.1.183 e PY12.1.260) e da braquiária (PY12.0.038i). Sabendo que o patógeno pode sobreviver nas sementes, e o Brasil é o maior exportador de sementes de forrageiras tropicais, principalmente para países da América Latina, países africanos e asiáticos, importância deve ser dada ao controle sanitário das mesmas. Aproximadamente, 38% das exportações são de sementes de *B. brizantha* cv. Marandu, 26% de *B. decumbens* e 15% de *B. brizantha* cv. MG-5 Vitória (TSUHAKO, 2010). A transmissão de *M. oryzae* pelas sementes em trigo foi verificada por Urashima et al. (2009), entretanto, Teixeira (2014) não observou a transmissibilidade de *M. oryzae* das sementes inoculadas artificialmente para as plântulas de trigo. Assim, não está claro o papel da semente na epidemiologia da brusone. Marcel et al. (2010), inferiram que

em arroz, o patógeno pode crescer endofiticamente e requer uma rota independente para a produção do conídio de infecção, e as plantas doentes serviriam de fonte de inóculo para as plantas saudáveis.

Outra importante observação, foi o CS de apenas 0,11 entre o isolado obtido de milhã (*Digitaria sanguinalis* - PY12.0.009 – grupo 1) e os isolados obtidos do trigo (grupo 5) (Figura 7). É muito provável que a espécie do isolado de milhã seja *M. grisea*, diferente de *M. oryzae*, de acordo com a proposição de Couch & Kohn (2002). Tal situação justifica a condição do CS ser tão baixo.

Os outros grupos formados (Figura 6) entre os isolados parentais dos diferentes hospedeiros foram: (1) *Digitaria sanguinalis* (PY12.0.009) e *Eragrotis plana* (PY12.0.046i), coeficiente de similaridade de 0,48; (2) *Brachiaria spp.* (PY12.0.146) e *Panicum maximum* (PY12.0.222), coeficiente de similaridade de 0,54; (3) *Cenchrus echinatus* (PY12.0.324); (4) *Digitaria sanguinalis* (PY12.0.001).

3.3 Variabilidade genética em reisolados de infecções conjuntas de isolados de *Magnaporthe oryzae* do trigo e de poáceas invasoras com idiomorfos compatíveis

A partir das inoculações conjuntas dos isolados de *M. oryzae* de diferentes hospedeiros, observou-se reisolados que não amplificaram fragmentos de DNA para alguns dos marcadores utilizados, ou amplificaram com um tamanho de

fragmento diferente dos parentais, podendo ser considerados como reisolados variantes. Para Pereira et al. (2014), a falta de amplificação, pode ser uma consequência dos mecanismos que geram a variabilidade, como mutações, deleções ou inserções de DNA no local de iniciação do marcador, ou ainda, recombinação. Pôde-se observar que para alguns marcadores, os reisolados amplificaram igualmente ao isolado obtido do trigo e/ou igualmente ao isolado obtido da planta invasora, assim, não foram considerados como reisolados variantes.

Dos 20 conjuntos de isolados inoculados, em sete, não houve reisolados variantes, em 5 conjuntos, identificou-se 10 % dos reisolados como variantes, em 3 conjuntos, observou-se 25 % dos reisolados como variantes, e em 5 conjuntos, evidenciou-se mais de 50 % dos reisolados como variantes (Tabela 5). Quanto a capacidade de cruzamento entre isolados do hospedeiro trigo com isolados de plantas invasoras, Galbieri & Urashima (2008), observaram *in vitro*, isolados de trigo que não cruzaram com isolados de plantas daninhas como *C. echinatus*, *E. indica*, *Setaria itálica*, *S. geniculata*, *D. sanguinalis*, *Pennisetum purpureum*, *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa*, diferente do observado por Yaegashi & Nishihara (1976), que inferem que a maioria dos isolados de *M. oryzae* que atacam as plantas daninhas apresentam potencial de cruzamento para com os isolados de *M. oryzae* do trigo.

Tabela 5. Identificação dos conjuntos inoculados (hospedeiros do patógeno), e a porcentagem de reisolados variantes de *Magnaporthe oryzae*. Passo Fundo-RS, 2016

Reisolados variantes nos conjuntos inoculados (%)		0%	10%	25%	≥50%
PY12.1.260 x PY12.0.009 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Digitaria sanguinalis</i>)	PY12.1.260 x PY12.0.056i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>indica</i>)	PY12.1.260 x PY12.0.023i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>sudanense</i>)	PY12.1.260 x PY12.0.543i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Elionurus candidus</i>)	PY12.1.183 x PY12.0.023i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Sorghum</i>)	
PY12.1.260 x PY12.0.016 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Chloris</i> spp.)	PY12.1.260 x PY12.0.055 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>multiflorum</i>)	PY12.1.183 x PY12.0.642i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>echinatus</i>)	PY12.1.183 x PY12.0.642i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Cenchrus echinatus</i>)	PY12.1.183 x PY12.0.705 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Chloris</i> spp.)	
PY12.1.260 x PY12.0.070 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Avena sativa</i>)	PY12.1.183 x PY12.0.008 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>rotundus</i>)	PY12.1.183 x PY12.0.594i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Avena sativa</i>)	PY12.1.183 x PY12.0.594i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Brachiaria</i> spp.)	PY12.1.183 x PY12.0.038i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Brachiaria</i> spp.)	
PY12.1.260 x PY12.0.578i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Cynodon</i> spp.)	PY12.1.183 x PY12.0.146 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Brachiaria</i> spp.)			PY12.1.183 x PY12.0.172 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Echinochloa</i> spp.)	
PY12.1.260 x PY12.0.046i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Eragrostis plana</i>)	PY12.1.183 x PY12.0.222 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>maximum</i>)			PY12.1.183 x PY12.0.051i (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Rhynchoselytrum repens</i>)	
PY12.1.260 x PY12.0.001 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Digitaria sanguinalis</i>)					
PY12.1.183 x PY12.0.324 (<i>Triticum aestivum</i> x <i>echinatus</i>)					

Nos conjuntos inoculados, em que se obteve 0% de reisolados variantes, prevaleceu o parental isolado do trigo, PY12.1.260, identificado como MAT1-1 e de baixa fertilidade. E nos conjuntos inoculados, com mais de 50% de reisolados variantes, identificou-se o isolado parental obtido do trigo PY12.1.183, com idiomorfo MAT1-2 e média fertilidade (Tabela 5.). Nos trabalhos de fertilidade entre isolados de *M. oryzae*, Valent et al. (1986), Notteghem & Silué (1992), e Bruno & Urashima (2001), há inferências de que a alta fertilidade é condição pré-requisito para ocorrência da reprodução sexual com formação de todas as estruturas sexuais, influenciando na variabilidade de *M. oryzae*.

Quanto a presença de estruturas sexuais nas folhas de trigo, não foi identificado peritécios após 30 dias das inoculações conjuntas. Entretanto, não significa que as mesmas não foram formadas, pois, Hayashi et al. (1997), observaram a formação dos órgãos sexuais em bainhas foliares de arroz, 12 dias após a inoculação de suspensão de conídios de diferentes isolados misturados, e Silué & Notteghem (1990), realizaram inoculações de conjuntos de isolados em plantas de arroz em desenvolvimento, com a observação de peritécios, ascas e ascósporos, dentro dos tecidos foliares, 15 dias após a inoculação. Possivelmente o período de 30 dias (tempo necessário para formação dos peritécios *in vitro* para os isolados estudados), que se estipulou para a investigação *in planta* tenha sido alto, pois os peritécios quando maduros rompem-se naturalmente e liberam as ascas, que por sua vez, por serem evanescentes, facilmente dispersam os ascósporos que

germinam e reiniciam o processo infectivo no hospedeiro. Moreira et al. (2015), descreveram as diferentes condições de indução da fase sexual *in vitro*, e as condições de luz, de temperatura e de nutrientes, que variam entre os isolados de diferentes hospedeiros e regiões geográficas. A ocorrência da parassexualidade como fonte geradora da variabilidade encontrada, também não pode ser descartada, ela funciona como um mecanismo que confere vantagens adaptativas à espécie por permitir que a nível somático se conjugue informações genéticas de dois indivíduos. É uma possibilidade de recombinação para aqueles fungos em que a fase sexual inexistente ou ocorre com baixa frequência (AZEVEDO, 2008). No entanto, a compatibilidade vegetativa dependente do reconhecimento do gene *hat* entre dois isolados, que não foi objeto de estudo deste trabalho.

Quanto aos reisolados obtidos dos dois conjuntos inoculados com o isolado parental de *D. sanguinalis* (milhã), identificou-se a semelhança genética dos reisolados (A1 até A10 e F1 até F10) para com o isolado parental obtido de trigo (Figura 7), assim, entendeu-se que a patogenicidade de isolados do hospedeiro milhã no trigo, é baixa. Valent et al. (1986), inferiram que isolados de *Digitaria* spp. não tem qualquer influência na variabilidade da brusone do trigo, bem como isolados de *M. oryzae* e *M. grisea* não compartilham as mesmas sequências genéticas (TAKAN et al., 2012). Observou-se também, que dos 24 marcadores utilizados, 15 não amplificaram fragmentos do DNA do isolado obtido de milhã, isso aconteceu, possivelmente porque os marcadores foram desenvolvidos a

partir de uma biblioteca genômica de fragmentos de isolados obtidos do trigo não reconhecendo o isolado de *D. sanguinalis*. No mesmo contexto, apenas 4 marcadores reconheceram a estrutura genética do isolado PY12.0.046i, obtido de *Eragrotis plana* (capim-anoni) e foi justificável, uma vez que o CS do isolado em questão, com o isolado de milhã (PY12.0.009) foi de 0,48 (Figura 7 – grupo 1), e com o isolado obtido de trigo (PY12.1.260) foi de apenas 0,1, assim, os marcadores também não reconheceram o isolados obtido de capim-anoni. A observação de isolados de *M. oryzae* não patogênicos em plântulas e espigas de trigo foi documentada por Danelli (2015), para os isolados obtidos das plantas invasoras capim-amargoso, milhã, aveia, braquiária, capim-arroz, capim-colonião e capim-carrapicho.

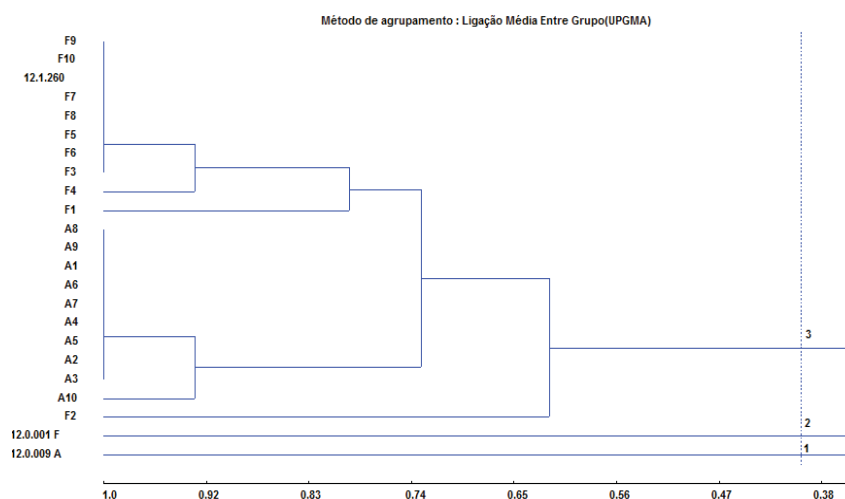


Figura 7. Dendrograma de dois conjuntos inoculados. (1 e 2) Isolados parentais obtidos de *Digitaria sanguinalis*; (3) Isolado parental obtido de *Triticum aestivum* com os reisolados do conjunto A e do F. Passo Fundo-RS, 2016

Nos conjuntos em que não houve a identificação de variantes (0%), observou-se que todos os reisolados foram geneticamente similares ao isolado parental obtido do trigo (Figura 8), e assim os isolados dos hospedeiros milhã, capim de rhodes, aveia, tifton, capim-anoni, e capim-carrapicho, puderam ser considerados como de baixa capacidade competitiva. A superioridade competitiva de uma população pode ser atribuída a vantagens relativas à capacidade reprodutiva, pois em determinada condição climática, alguns indivíduos tem maior sucesso reprodutivo do que outros (PRABHU & FILIPPI, 2006). Em estudos de dinâmica populacional, considera-se como unidade de frequência na população, o indivíduo, e não um gene específico (PRABHU & FILIPPI, 2006), sendo assim, pôde-se dizer que houve uma maior frequência de *M. oryzae* do trigo.

Por esse motivo, a população tende a uma estabilização genética, o que facilitaria a identificação de genes de resistência para àquela população. Entretanto, devido à complexidade biológica do gênero *Magnaporthe*, a existência da recombinação sexual e parassexual gerando indivíduos geneticamente diferentes, e a presença de muitas regiões repetidas no genoma de *M. oryzae* que facilitam as mutações, levam a uma seleção direcional para a maior capacidade adaptativa e rapidamente se elimina a efetividade dos genes de resistência.

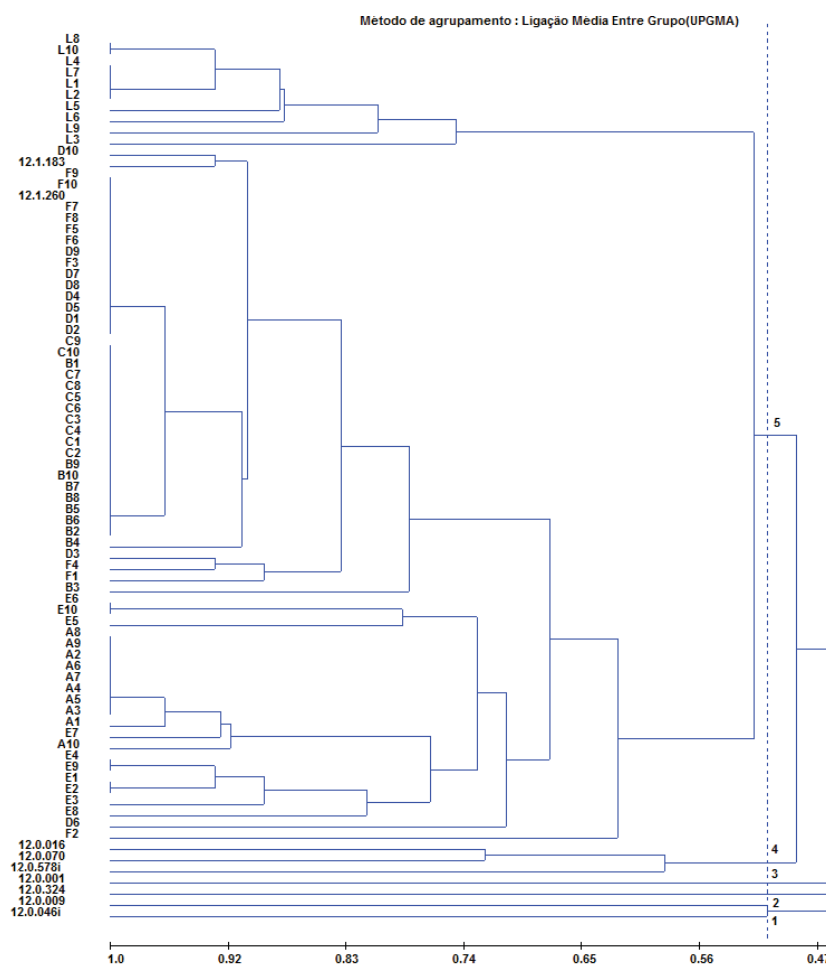


Figura 8. Dendrograma de 0% de reisolados variantes. (1) Isolados parentais obtido de *Eragrotis plana* e *Digitaria sanguinalis*; (2) Isolado parental obtidos de *Cenchrus echinatus*; (3) Isolado parentai obtido de *Digitaria sanguinalis*; (4) Isolados parentais obtidos de *Cynodon spp.*, *Avena sativa*, *Chloris spp.*; (5) Dois isolados parentais obtidos de *Triticum aestivum*, e reisolados do conjunto A,B, C, D, E, F, e L. Passo Fundo-RS, 2016

Para os conjuntos inoculados, em que houve um reisolado diferente geneticamente dos parentais, entendeu-se que os isolados parentais que formaram estes conjuntos, contribuíram com 10 % para a variabilidade de *M. oryzae*. E o restante dos reisolados, destes mesmos conjuntos, foi identificado como similar ao isolado parental obtido do trigo ou

do isolado obtido da planta invasora (Figura 9). Àqueles conjuntos inoculados em que se observou de dois a três reisolados variantes, entendeu-se que houve uma contribuição na variabilidade de 25% (Figura 10), e para os conjuntos inoculados em que se identificaram cinco ou mais reisolados diferentes dos parentais, entendeu-se que a contribuição na variabilidade do patógeno foi igual ou superior a 50% (Figura 11). Independente do quanto cada conjunto inoculado contribuiu para a variabilidade, ressalta-se que, a mesma ocorreu em condições de ambiente favorável e controlado, e com inoculações artificiais de concentração de conídios superior do que habitualmente se encontra na natureza de forma espontânea.

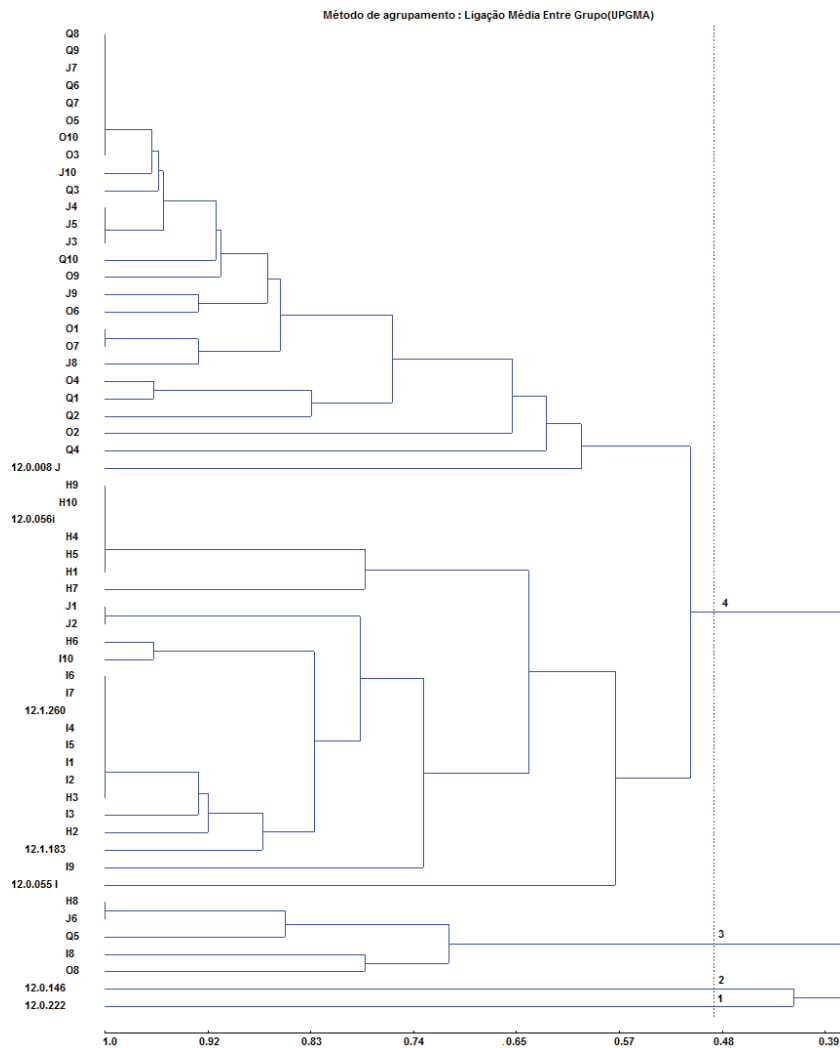


Figura 9. Dendrograma de 10% de reisolados variantes. (1) Isolado parental obtido de *Panicum maximum*; (2) Isolado parental obtido de *Brachiaria spp.*; (3) Reisolados variantes I, J, Q, e O, dos conjuntos inoculados ; (4) Isolados parentais obtidos de *Triticum aestivum*, *Eleusine indica*, *Lolium multiflorum*, *Cyperus rotundus* e reisolados não variantes dos conjuntos H, I, J, O e Q. Passo Fundo-RS, 2016

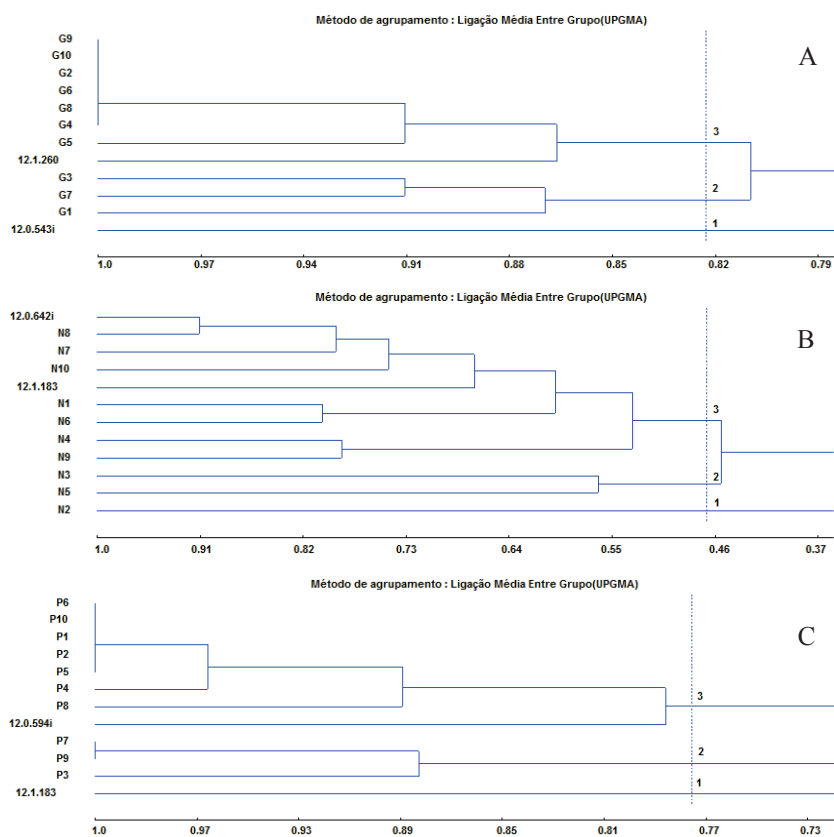


Figura 10. Dendrograma de 25% de reisolados variantes. (A) 1-Isolado parental obtido de *Elionurus candidus*; 2-Reisolados G variantes; 3-Isolado parental obtido de *Triticum aestivum* e reisolados G não variantes. (B) 1 e 2- Reisolados N variantes; 3-Isolado parental obtido de *Triticum aestivum*, de *Cenchrus echinatus*, e reisolados N não variantes. (C) 1-Isolado parental obtido de *Triticum aestivum*; 2-Reisolados P variantes; 3-Isolado parental obtido de *Avena sativa* e reisolados P não variantes. Passo Fundo-RS, 2016

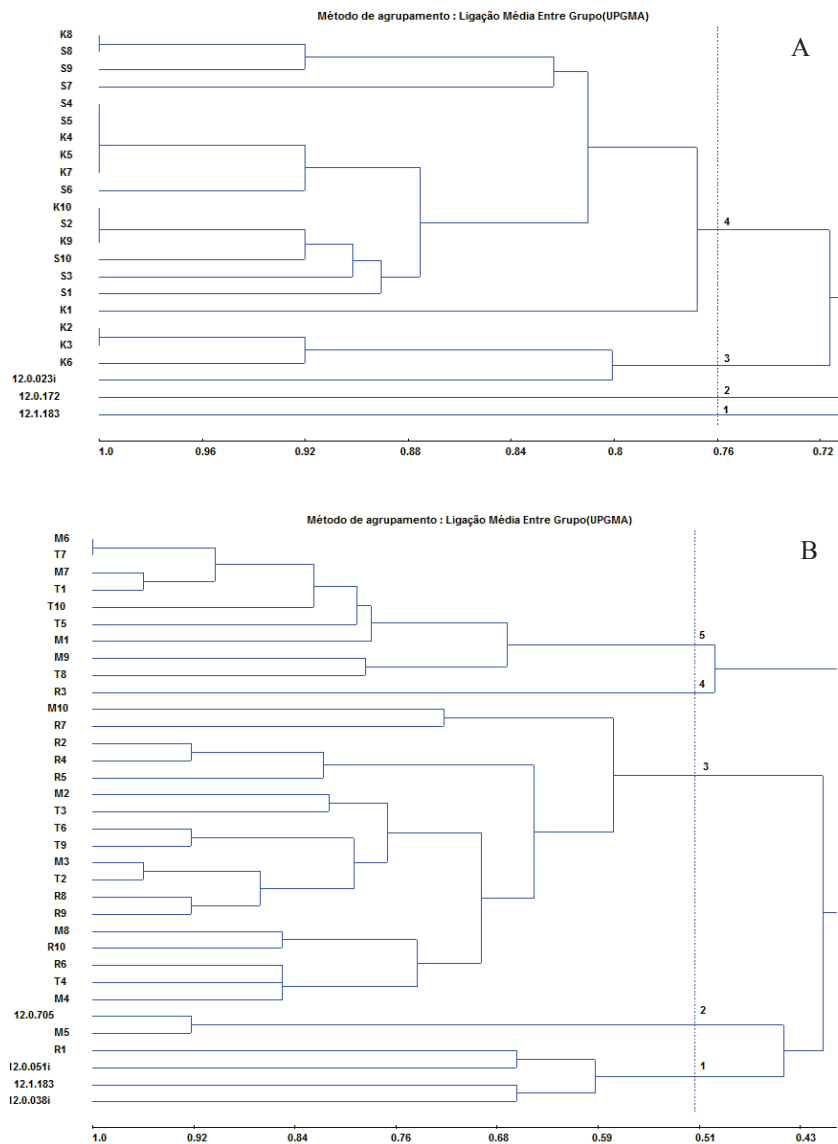


Figura 11. Dendrograma de $\geq 50\%$ de reisolados variantes. (A) 1-Isolado parental obtido de *Triticum aestivum*; 2-Isolado parental obtido de *Echinochloa* spp.; 3-Isolado parental obtido de *Sorghum sudanense* e reisolados K não variantes; 4-Reisolados K e S variantes. (B) 1-Isolados parentais obtidos de *Triticum aestivum*, *Brachiaria* spp., *Rhynchelytrum repens*; 2-Isolado parental obtido de *Chloris* spp. e reisolados não variantes; 3,4 e 5- Reisolados M, R e T variantes. Passo Fundo-RS, 2016

Os isolados obtidos de *Avena sativa* (PY12.0.070 e PY12.0.594i), e os isolados obtidos de *Cenchrus echinatus* (PY12.0.324 e PY12.0.642i), comportaram-se diferente frente a indução da variabilidade. O isolado PY12.0.070 (MS), quando submetido a inoculação conjunta com o isolado obtido de trigo PY12.1.260 não apresentou reisolados variantes (Figura 8), enquanto que para o isolado PY12.0.594i (PR), inoculado conjuntamente com o isolado obtido de trigo PY12.1.183, houve a presença de 25% de variantes dentre os reisolados (Figura 10C). Para os isolados obtidos de capim-carrapicho, ambos foram inoculados com o isolado obtido de trigo PY12.1.183, e houve 0% de variantes para o conjunto com o isolado PY12.0.324 (MS) (Figura 8), e 25% de variantes para o conjunto com o isolado PY12.0.642i (PR) (Figura 10B). No primeiro caso, com os isolados da aveia, PY12.0.070 e PY12.0.594i, possivelmente o nível de fertilidade e compatibilidade com os diferentes isolados de trigo tenha influenciado, além da variabilidade intraespecífica entre os isolados de aveia, que foi identificada pelo CS de 0,41 (Figura 6). Entretanto, no segundo caso, com os isolados de capim-carrapicho, com um CS de apenas 0,17 entre os isolados PY12.0.324 e PY12.0.642i (Figura 6), entendeu-se que um padrão de resposta para cada hospedeiro é dependente da amostragem, pois as diferenças genéticas e fenotípicas do patógeno podem ocorrer geograficamente e temporalmente (CHEN et al., 1995). Da mesma forma, Danelli (2015), expõem que os isolados de *M. oryzae* das plantas invasoras não apresentam um padrão de patogenicidade para cada hospedeiro.

Dentre os isolados parentais que contribuíram com mais de 50% para a variabilidade de *M. oryzae* (Figura 11), identificou-se os isolados obtidos de capim-sudão (*Sorghum sudanense*), de capim de rhodes (*Chloris* spp.), de braquiária (*Brachiaria* spp.), de capim-arroz (*Echinochloa* spp.), e de capim favorito (*Rhynchelytrum repens*). De acordo com Danelli (2015), o grupo racial formado por isolados de braquiária e de capim-sudão, foi o único que apresentou virulência para todos os genótipos de uma série diferenciadora de raças, e para Bruno e Urashima (2001), isolados obtidos de braquiária e de capim rabo de raposa (*Setaria geniculata*), mostraram capacidade de cruzar sexualmente com isolados obtidos de trigo, formando peritécios, ascas e ascósporos. Assim, identificou-se que, a braquiária, é um hospedeiro em potencial, para contribuir com a variabilidade de *M. oryzae* do trigo.

Dentre as espécies estudadas, hospedeiras do patógeno, a gênero *Brachiaria*, ocupou destaque, pois ambos foram inoculados conjuntamente com o isolado de trigo identificado como de alta fertilidade (PY12.1.183), e mostraram respostas contrastantes quanto a obtenção de reisolados variantes. No conjunto com o isolado PY12.0.038i (PR), identificou-se mais de 50% de variantes, enquanto que com o isolado PY12.0.146 (MS), apenas 10% de variantes (Tabela 5). A similaridade entre os isolados obtidos de braquiária foi baixa, CS de 0,093, assim se sugere que estudos com esta planta invasora sejam explorados, iniciando com uma ampla amostragem de isolados de *M. oryzae* de braquiária. A limitação da expansão do cultivo do trigo no cerrado brasileiro, em

decorrência do controle ineficiente da brusone, atribuído em parte, à variabilidade do patógeno, é justamente onde o cultivo da forrageira avança anualmente sobre áreas de mata, frente às dificuldades legais encontradas para o desmatamento, sobre encostas, recebendo fomento de projetos de restauração de rodovias, e sobre áreas com pastagens degradadas, devido ao rápido restabelecimento da cultura após as queimadas (RIBEIRO et al., 2005).

O presente trabalho representa uma análise quantitativa e qualitativa da importância e da diferença que cada espécie de planta daninha, de onde os isolados utilizados no trabalho foram obtidos, significa na geração de variabilidade de *M. oryzae* do trigo. A diferença na similaridade genética encontrada entre os reisolados e os isolados parentais é um parâmetro quantitativo do quanto algumas plantas hospedeiras da família Poaceae exercem esse papel diferenciado. Entretanto, é importante destacar que os resultados foram obtidos em um ambiente de simulação biológica, sob condições controladas e com inoculações artificiais.

4 CONCLUSÕES

a) Na população estudada de *M. oryzae* do trigo, das regiões produtoras do cereal no Brasil, prevalece a forma compatível MAT1-1, macho e de baixa fertilidade, o que dificulta a compatibilidade sexual com outros isolados de *M. oryzae* do trigo. Entretanto, os isolados de poáceas invasoras MAT1-2, criam uma condição favorável para a recombinação sexual.

- b) A formação de estruturas sexuais *in vitro* se comporta diferentemente de *in vivo*, necessitando de ajustes metodológicos para visualizar a sua presença.
- c) A ocorrência de variantes do patógeno *in vivo*, indica que as plantas invasoras *Sorghum sudanense*, *Chloris* spp., *Brachiaria* spp., *Echinochloa* spp., e *Rhynchelytrum repens* são além de hospedeiros alternativos do patógeno, fontes geradoras de variabilidade. E que essa, é influenciada também, pela similaridade genética entre os isolados e pelo nível de fertilidade dos isolados.
- d) Os isolados mais similares aos isolados de trigo foram os obtidos de *Eleusine indica*, de *Rhynchelytrum repens*, de *Cenchrus echinatus*, de *Brachiaria* spp., de *Sorghum sudanense*, de *Chloris* spp., de *Echinochloa repens*, e de *Elionurus candidus*. Os isolados mais dissimilares foram os de *Eragrotis plana* e de *Digitaria sanguinalis*.

CAPÍTULO II

SENSIBILIDADE “*IN VITRO*” DE *Magnaporthe oryzae* DO TRIGO A FUNGICIDAS INIBIDORES DO CRESCIMENTO MICELIANO

CRISTINA BOARETTO¹

RESUMO – A ampla variabilidade genética de *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone do trigo, tem dificultado a obtenção de fontes de resistência. Dentre as opções para manejar a doença, o controle químico é a principal, mas com uma eficiência máxima de 50% em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. Objetivou-se avaliar *in vitro* a sensibilidade do crescimento miceliano de isolados de *M. oryzae* ao antibiótico casugamicina, aos fungicidas carbendazim, triciclazol, tebuconazol, protioconazol, e à mistura comercial protioconazol+trifloxistrobina. Os fungicidas foram acrescentados ao meio BDA, nas concentrações de 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 100,00 mg L⁻¹. A fungitoxicidade dos produtos foi determinada por meio da CI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento miceliano), e a sensibilidade dos isolados classificada em alta, moderada, baixa e insensível. O modelo que melhor se ajustou aos dados obtidos foi o de Weibull, com quatro parâmetros. Os isolados em sua

¹ Eng^a. Agr^a., mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, bolsista CAPES/Embrapa, Projeto “*Magnaporthe oryzae*: O desafio da tropicalização do trigo no Brasil.”

maioria foram insensíveis ao antibiótico kasugamicina, e altamente sensíveis aos demais fungicidas estudados. O triciclazol e a mistura prothioconazol+trifloxistrobina foram os fungicidas que apresentaram a maior fungitoxicidade.

Palavras-chave: brusone, concentração inibitória, controle químico.

**WHEAT *Magnaporthe oryzae* “IN VITRO” SENSITIVITY
TO FUNGICIDES THAT INHIBIT MYCELIAL
GROWTH**

ABSTRACT - The great variability of *Magnaporthe oryzae*, the causal agent of wheat blast, has made it difficult to obtain sources of resistance. Among the options to manage the disease, chemical control is the main, but with a maximum efficiency of 50% in favorable conditions for the development of the disease. The objective was to evaluate the in vitro sensitivity of the mycelial growth of isolates of *M. oryzae* to kasugamycin antibiotic, to the fungicides carbendazim, tricyclazole, tebuconazole, prothioconazole and the commercial mixture prothioconazole+trifloxystrobin. The fungicides were solubilized in PDA medium at concentrations of 0.00; 0.01; 0.10; 1.00; 10.00 and 100.00 mg L⁻¹. The toxicity of the products was determined by means of EC₅₀ (concentration necessary to inhibit 50% of the mycelium growth), and the sensitivity of the isolates classified according into high, moderate, low and insensitive. The model that best fit the data obtained was the Weibull modulus with four parameters. The

isolates were mostly insensitive to the antibiotic kasugamycin, and highly sensitive to the other studied fungicides. The tricyclazole and prothioconazole+trifloxystrobin mixture were the fungicides that had the highest fungus toxicity.

Key words: blast, inhibitory concentration, chemical control.

1 INTRODUÇÃO

A brusone do trigo, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, pode causar danos que variam em relação à região geográfica onde ocorre e à intensidade da doença. Santana et al. (2013), ao avaliarem a eficiência de fungicidas usados no controle da brusone do trigo, em Londrina-PR, Planaltina-DF, Palotina-PR e Itaberá-SP, relataram danos de 12,8%, 14,5%, 37,6% e 69,7%, respectivamente.

O controle da doença envolve uma série de medidas, como semeadura de cultivares com maior nível de resistência, a utilização de sementes saudáveis, a escolha da melhor época de semeadura evitando a coincidência de condições favoráveis à doença com a extrusão das espigas, e controle químico de parte aérea e de semente (REUNIÃO, 2014). Os produtos químicos registrados para o controle da brusone são poucos, bem como a eficiência dos mesmos é baixa quando ocorrem as condições ambientais favoráveis a doença (REUNIÃO, 2013).

A baixa eficiência dos fungicidas aplicados nos órgãos aéreos das plantas, pode estar associado a variabilidade genética do patógeno, o qual, apresenta um padrão racial (CRUZ

et al., 2009; MACIEL et al., 2014; DANELLI, 2015) e a existência de populações do patógeno resistentes aos ingredientes ativos, como para as estrobilurinas (CASTROAGUDIN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, o uso repetido dos mesmos ingredientes ativos pode alterar a sensibilidade dos fungos aos fungicidas, acarretando em uma seleção de patótipos resistentes, influenciando na eficiência do manejo químico (DEKKER, 1995).

Os fungicidas utilizados para o controle da brusone do trigo são triazois na forma isolado ou em misturas com estrobilurinas (SANTANA et al., 2013). Os triazois assim como o triazolinthione, são conhecidos pela ação de inibição da desmetilação (IDMs), atuam inibindo a retirada do grupo metila carbono quatorze (C14) da molécula, resultando num acúmulo de precursores de esteróis e redução do ergosterol (BRENT, 1995). Esta redução do ergosterol e a presença dos esteróis metilados, alteram a permeabilidade celular, levam ao acúmulo de ácidos graxos a níveis tóxicos para os fungos, e consequente ruptura e extravasamento de solutos intracelulares, e necrose celular (REIS et al., 2010; ZAMBOLIM et al., 2007). A ação dos IDMs é sistêmica, com ação protetora se ocorrer depósito sobre a superfície foliar. Não tem ação sobre a germinação dos conídios dos fungos, pois neste estágio o esporo utiliza os esteróis armazenados não necessitando de sua biossíntese para germinar (REIS et al., 2010). Assim, a sensibilidade de isolados de patógenos a esses fungicidas, *in vitro*, deve ser avaliada quantificando-se o crescimento miceliano e não a germinação.

Dados de sensibilidade de populações de *M. oryzae* que infectam trigo para os fungicidas com ação fungistática são inexistentes, entretanto há informações relacionadas à brusone em arroz. Na China na Província de Guangdong, região de cultivo de arroz, foi detectada a presença de uma população de *M. oryzae* com resistência ao ingrediente ativo carbendazim e diferentes graus de sensibilidade ao triciclazol (ZHANG et al., 2004). Ainda na China, ao se estudar 90 isolados de *M. oryzae* do arroz, Chen et al. (2013) mostraram a eficiência de 70% in vitro do epoxiconazol, e in planta de 75%, muito semelhante ao controle obtido com triciclazol, e superior ao carbendazim.

O triciclazol, do grupo químico dos benzotiazóis, juntamente com os triazóis apresenta eficiência acima de 90% no controle da brusone em arroz, isso possibilita a rotação de princípios ativos com diferentes mecanismos de ação, reduzindo a pressão de seleção sobre o patógeno e conseqüentemente os riscos de aparecimento de isolados resistentes (SCHEUERMANN & EBERHARDT, 2011).

Alguns fitopatógenos, como *M. oryzae* do arroz, tem na parede do apressório uma camada de melanina que funciona como uma barreira permeável, permitindo o aumento da concentração de alguns solutos citoplasmáticos como glicerol (PRABHU & FILIPPI, 2006), e o acréscimo da pressão de turgescência para romper mecanicamente a superfície foliar do hospedeiro (LI et al., 2015). Esta camada varia de isolado para isolado, pois há ao menos dois sinais de transdução envolvidos na formação do apressório e dependem da hidrofobicidade das folhas, bem como de genes como MGG1 que codificam

proteínas quinases (THINES et al., 2000; LI et al., 2015). O triciclazol tem sua ação desorganizando as funções da parede celular, inibe a biossíntese da melanina na parede do apressório, e compromete negativamente a penetração do patógeno na epiderme do hospedeiro e o desenvolvimento da infecção (REIS et al., 2010). Em isolados de *M. oryzae* do trigo não há informações sobre estes eventos celulares, mas a ampla variação de agressividade dos isolados do patógeno (DANELLI, 2015), pode indicar a influência da morfogênese do apressório e de seus processos bioquímicos na patogenicidade. A patogenicidade reduzida de *M. oryzae* em plantas de arroz e cevada por mutantes espontâneos do gene MET1, deixando de produzir metionina sintase, é exemplo recente da relação existente entre a agressividade do patógeno e rotas bioquímicas (SAINT-MACARY, 2015).

Devido à inexistência de informações sobre a fungitoxicidade de ingredientes ativos utilizados na cultura do trigo, para o controle de *M. oryzae*, e a baixa eficiência do controle químico, o presente trabalho objetivou determinar *in vitro*, a sensibilidade do crescimento miceliano de *M. oryzae* a diferentes produtos químicos e gerar seus valores de CI₅₀.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas instalações da Embrapa Trigo. A preparação dos meios de cultura, solubilização dos ingredientes ativos aos meios, obtenção do inóculo e desenvolvimento das colônias do fungo foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia.

Os 20 isolados monospóricos de *M. oryzae* utilizados nos experimentos, foram obtidos de espigas de trigo sintomáticas e folhas de braquiária (*Brachiaria plantaginea* (Link) R.D. Webster) (Tabela 1). Os isolados estavam preservados em papel filtro armazenados em tubos do tipo criotubo, a -20 °C. As colônias puras do fungo foram cultivadas em meio de ágar-aveia (1,0 L água destilada + 60 g de farinha de aveia + 15 g de ágar) por 15 dias, armazenadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura em torno de 25 °C ± 2 °C.

Tabela 1- Identificação e origem dos isolados de *Magnaporthe oryzae*. Passo Fundo-RS, 2016

Identificação	Hospedeiro/ cultivar	Coordenadas	Local coleta	de	Data da coleta
Py 12.0.012i	Braquiária	S 23°18'00,7" - WO 51°16'42,2"	Londrina, PR		2012
Py 12.1.017i	CD 104	S 23°18'02,2" - WO 51°16'43,4"	Londrina, PR		2012
Py 12.1.298	Mirante	S 23°20'03,0"- WO 51°17'43,0"	Rolândia - PR		2012
Py 12.1.329	CD 104	S 23°17'51,6"- WO 51°06'18,1"	Londrina, PR		2012
Py 12.1.331	Mirante	S 23°13'42,3"- WO 51°15'40,5"	Londrina, PR		2012

Py 12.1.337	Marfim	S 23°11'44,0" WO 51°14'30,4"	Londrina, PR	2012
Py 12.1.029i	CD 116	S 23°33'08,8" WO 49°03'24,9"	Itaí, SP	2012
Py 12.1.011	BRS 264	S 19°02'15,2" W 47°05'55,6"	Patrocínio, MG	2012
Py 12.1.077	BR 18	S 19°18'29,8" W 47°26'15,9"	Perdizes, MG	2012
Py 12.1.041	BR 18	S 17°37'26,2" W 51°04'11,4"	Rio Verde, GO	2012
Py 12.1.054	BR 18	S 17°50'25,4" W 51°11'00,5"	Rio Verde, GO	2012
Py 12.1.115	BR 264	S 16°01'23,4" W 47°37'50,9"	Brasília, DF	2012
Py 12.1.132	BRS Guamirim	S 23°02'06,9" WO 55°16'59,3"	Amambai, MS	2012
Py 12.1.184	Trigo	S 22°57'38,3" WO 55°19'58,4"	Aral Moreira, MS	2012
Py 12.1.183	Trigo	S 22°19'26,6" WO 54°49'08,1"	Dourados, MS	2012
Py 12.1.247	BRS 208	S 23°00'20,1" WO 55°23'02,8"	Amambai, MS	2012
Py 12.1.322	IPR 85	S 23°02'02,8" WO 55°25'16,9"	Aral Moreira, MS	2012
Py 12.1.319	IPR 85	S 22°49'27,2" WO 55°16'52,5"	Aral Moreira, MS	2012
Py 12.1.181	PF 070475	S -28°24'47,4" WO 54°45'48,7"	São Luiz Gonzaga, RS	2012
Py 12.1.209	PF 090702	S -28°41'50,7" WO 55°57'57,2"	São Borja, RS	2012

Nos experimentos foram utilizados um antibiótico (casugamicina), quatro fungidas isolados (carbendazim, triciclazol, tebuconazol, e protioconazol) e uma mistura comercial (protioconazol+trifloxistrobina) (Tabela 2). A seleção dos fungidas se deu pelo uso dos mesmos no controle da brusone no arroz.

Tabela 2- Ingredientes ativos utilizados para determinar a sensibilidade miceliana, *in vitro*, de 20 isolados *Magnaporthe oryzae*. Passo Fundo-RS, 2016

Ingrediente ativo	Formulação comercial	Concentração do ingrediente ativo	Grupo químico
Casugamicina	Kasumin	20 g L ⁻¹	Antibiótico
Protioconazol	Proline EC	250 g L ⁻¹	Triazolinthione
Tebuconazol	Folicur 200 EC	200 g L ⁻¹	Triazol
Triciclazol	Bim® 750 BR	750 g kg ⁻¹	Benzotiazol
Carbendazin	Derosal 500 SC	500 g L ⁻¹	Benzimidazol
Protioconazol + Trifloxistrobina	Fox	175 g L ⁻¹ + 150 g L ⁻¹	Triazolinthione + Estrobirulina

Para avaliar a sensibilidade miceliana dos isolados, o método utilizado foi o de adicionar os fungicidas ao meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) (BECHER et al., 2010; TATEISHI et al., 2010; SPOLTI et al., 2012).

Para cada fungicida foi utilizado placas de Petri (90 mm de diâmetro x 15 mm de altura) novas, que após a realização do ensaio foram higienizadas e esterilizadas por no mínimo um mês, com formaldeído a vapor (formol 37%) (marca Quimicamar) (REIS, 2013), para depois serem usadas para a repetição do experimento.

Foram testadas as concentrações de 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 100,00 mg L⁻¹, para cada ingrediente ativo. A testemunha foi considerada o meio que não recebeu a incorporação de fungicida, ou seja, a 0,00 mg L⁻¹.

O preparo das suspensões das diferentes concentrações de fungicidas foi realizada pipetando-se uma alíquota do fungicida a um balão volumétrico com água destilada e esterilizada, totalizando um volume final de 100 mL

(solução estoque 1). Em seguida, retirou-se dessa solução 1,0 mL e transferiu-se para um balão com 99,0 mL de água destilada e esterilizada, formando a solução estoque 2 (AVOZANI et al., 2014). Após a autoclavagem e resfriamento do meio de cultura ágar-água até 40 °C, as soluções estoque foram adicionadas ao meio, e vertidas em placas de Petri.

Após a solidificação do meio de cultura, discos de micélio de 5,0 mm de diâmetro da colônia pura do fungo, foram transferidos para o centro de cada placa de Petri, sendo depositadas de modo a ficarem em contato com a superfície do meio. As placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, e fotoperíodo de 12 horas, fornecido por lâmpadas fluorescentes (Osram 40 W).

As avaliações iniciaram quando no tratamento testemunha visualizou-se que o crescimento miceliano havia atingido as bordas circulares da placa. Com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo[®]) mediu-se o maior diâmetro da colônia. Os valores gerados foram comparados com o crescimento do fungo no tratamento de 0,00 mg L⁻¹ (testemunha).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído de seis tratamentos e quatro repetições, feitos em duplicata. Para a determinação da CI₅₀, os dados foram submetidos ao modelo de Weibull com quatro parâmetros, $Y = d \exp(- \exp(b(\log x - e)))$, (KNEZEVIC et al., 2007), utilizando o programa R (R Core Team (2015)). Para Y considerou-se o diâmetro da colônia, para X, as diferentes doses dos fungicidas, e para d, b, e, os parâmetros da equação da distribuição de

Weibull. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>) para a análise dos dados, com o pacote DRC que contém o procedimento probit.

Para classificar a sensibilidade em grupos foi utilizado uma escala proposta por Edgington et al. (1971), com modificações, considerando-se como: alta sensibilidade (AS) os isolados com $CI_{50} < 1,0 \text{ mg L}^{-1}$; moderada sensibilidade (MS) os isolados de CI_{50} entre 1,0 e 10,0 mg L^{-1} ; baixa sensibilidade (BS) os isolados de CI_{50} entre 10,0 e 50,0 mg L^{-1} ; e insensível (I) os isolados de $CI_{50} > 50,0 \text{ mg L}^{-1}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de sensibilidade da população de *M. oryzae* amostrados, representativos de seis regiões produtoras de trigo no Brasil, apresentaram níveis distintos de sensibilidade para o antibiótico casugamicina (Tabela 3). Devido a ocorrência de valores de CI_{50} entre 10,0 e 50,0 mg L^{-1} , incluiu-se esse nível de sensibilidade na escala proposta por Edgington et al. (1971), considerando como baixa sensibilidade (BS). Já, para os outros fungicidas testados não houve diferença de sensibilidade entre os isolados estudados (Tabela 3 e 4).

O antibiótico casugamicina, penetrante sistêmico (REIS et al., 2010), foi fungitóxico para 50% dos isolados estudados, e atóxico para o restante da população de *M. oryzae* do trigo e também para o isolado de braquiária (Tabela 3). Possui registro para o controle da brusone no arroz, e por esse

motivo foi testado em isolados de trigo, mas mostrou não ser eficiente. Apesar de inibir a germinação dos esporos e o crescimento do micélio em baixas doses, no Japão, o uso de casugamicina já foi limitada devido à ocorrência de cepas resistentes (PRABHU & FILIPPI, 2006). E no Rio Grande do Sul, ensaios a campo no ano agrícola de 2014/2015, em arroz irrigado por aspersão, a casugamicina mostrou controle de apenas 7% sobre a doença enquanto o melhor tratamento apresentou 68% (NUNES et al., 2015). O que poderia explicar a baixa eficiência de um ingrediente ativo supostamente ainda não utilizado para o controle da brusone no trigo seria a insensibilidade natural do patógeno à molécula, atributo que depende das interações entre as características da molécula e a genética do fungo, ou, a ocorrência de fluxo gênico entre isolados resistentes e sensíveis de espécies distintas.

Não houve diferença de sensibilidade entre os 20 isolados para os fungicidas carbendazim, tebuconazol, prothioconazol, tricyclazole, e prothioconazol+trifloxistrobina, todos foram classificados como de alta sensibilidade. Os valores de CI_{50} médios para os fungicidas acima, foram respectivamente: 0,5932 mg L⁻¹, 0,5087 mg L⁻¹, 0,1093 mg L⁻¹, 0,0622 mg L⁻¹, 0,0304 mg L⁻¹. Com isso, todos foram fungitóxicos, e a mistura comercial mostrou ser a mais potente.

Para o carbendazim a CI_{50} variou de 0,304 a 1,001 mg L⁻¹ (Tabela 3). Em arroz existem alguns trabalhos que podem ser usados para comparação de resultados, como o de Zhang et al. (2004), estudando a sensibilidade de 129 isolados de *P. oryzae* do arroz, o fungicida apresentou CI_{50} que variou

de 0,1096 a 9,1543 mg L⁻¹. A resistência cruzada para o arroz também já foi relatada para os benzimidazois: carbendazim, tiofanato metílico e thiabendazole (PRABHU & FILIPPI, 2006). Ação dos benzimidazois é sistêmica e afeta especificamente a divisão celular, pois apresentam atividade seletiva para a tubulina de fungos (REIS et al., 2010). Esta especificidade faz com que esse grupo químico apresente alto risco de resistência adquirida pelo patógeno. Devido a essas características, os isolados resistentes geralmente são tão adaptados quanto os sensíveis. Portanto, a alta pressão de seleção causada pelo uso intensivo dos benzimidazois, pode resultar na seleção de isolados resistentes em um curto período de tempo (KENDALL et al., 1994; WHEELER et al., 1995).

O fungicida triciclazol, grupo químico dos benzotiazóis, se mostrou altamente fungitóxico aos isolados de *M. oryzae* do trigo, com CI₅₀ entre 0,0006 e 0,298 mg L⁻¹ (Tabela 3). Assim, acredita-se que *M. oryzae* de outros hospedeiros, além do arroz, possui ativa a via biossintética de melanização da parede do apressório. O triciclazol dentre os produtos registrados para o controle da brusone no arroz, é o mais utilizado no Brasil, e é de 25 a 35 vezes mais ativo contra o desenvolvimento do fungo *in vivo* do que contra o crescimento micelial e a germinação de esporos *in vitro* (PRABHU & FILIPPI, 2006). Fato esse, que pode ser explicado pela sua absorção pela planta e translocação para partes não expostas no momento da aplicação (NUNES et al., 2015), aumentando a atividade residual do produto e reduzindo o número das aplicações. Em arrozais do Nepal, compararam-se fungicidas

para o controle da brusone, o resultado foi que dentre os estudados, o triciclazol obteve o maior controle da brusone em folhas e em panículas, respectivamente de 87,08% e 79,62%. E o menor controle foi atribuído a casugamicia, em folhas de 59,98% e em espigas de 43,18% (MAGAR et al., 2015).

Apesar da alta sensibilidade dos isolados estudados ao triazol (tebuconazol) e ao triazolinthione (protioconazol), a fungitoxicidade do protioconazol foi 5 vezes superior a do tebuconazol (Tabela 4). Para a mancha amarela do trigo (*Drechslera tritici-repentis*), a CI_{50} média para o tebuconazol foi de 0,66 mg L⁻¹ e para o protioconazol de 0,22 mg L⁻¹ (TONIN et al., 2015). Em soja, os valores de CI_{50} para sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* ao tebuconazol variaram de 0,001 a 1,19 mg L⁻¹, e para o protioconazol de 0,000001 a 0,39 mg L⁻¹ (XAVIER et al., 2015). Para o falso carvão do arroz (*Ustilagoideia virens*), recentemente foi documentada uma mutação gene Y137H que conferiu redução de sensibilidade para o tebuconazol (WANG et al., 2015).

O efeito fungitóxico do protioconazol combinado com a trifloxistrobina para crescimento miceliano, foi superior ao protioconazol isoladamente, para 75% dos isolados estudados (Tabela 4). Este resultado indicou que apesar das estrobilurinas interferirem na germinação, alguma ação preventiva de inibição do crescimento de *M. oryzae* nos estádios iniciais pós-germinação ocorreu, e foi devido à trifloxistrobina. A resistência de isolados às estrobilurinas geralmente são em decorrência de mutações pontuais G 143A, no gene *cyt b*, para muitos fitopatógenos. Para *M. oryzae* do trigo essa ocorrência já foi

confirmada para a azoxistrobina e também para piraclostrobina (OLIVEIRA et al., 2015), no entanto para trifloxistrobina não há relatos da ocorrência de resistência cruzada.

O uso repetido de um fungicida com mesmo sítio de ação pode levar ao surgimento de populações insensíveis e a falhas de controle da doença. Os resultados mostraram alta sensibilidade dos isolados de *M. oryzae* do trigo aos fungicidas, não justificando a falha de controle da doença observada a campo por produtores, que possivelmente esteja relacionada a outros fatores como aplicações em épocas erradas e ineficiência de cobertura da espiga.

Tabela 3 - Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano e sensibilidade de *Magnaporthe oryzae* do trigo a fungicidas. Passo Fundo-RS, 2016

Isolado	Origem	Concentração inibitória (CI50 mg L ⁻¹)				S ^x	
		Casugamicina	S ^x	Carbendazim	S ^x		
Py12.0.012i	Londrina, PR	>100,0 (±591,88) ^y	I	0,304 (±0,0437) ^y	AS	0,042(±0,0660) ^y	AS
Py12.1.017i	Londrina, PR	34,63 (±51,56)	BS	0,611 (±0,1430)	AS	0,063 (±0,0010)	AS
Py 12.1.298	Rolândia - PR	11,22 (±8,1658)	BS	0,474 (±0,1477)	AS	0,028 (±0,0031)	AS
Py 12.1.329	Londrina, PR	>100,0 (±292,26)	I	0,342 (±0,1063)	AS	0,006 (±0,0153)	AS
Py 12.1.331	Londrina, PR	12,88 (±2,685)	BS	0,746 (±0,1068)	AS	0,054 (±0,0217)	AS
Py 12.1.337	Londrina, PR	>100,0 (±16,793)	I	0,497 (±0,1132)	AS	0,022 (±0,0172)	AS
Py 12.1.029i	Itaí, SP	6,92 (±1,6280)	MS	0,119 (±0,0837)	AS	0,023 (±0,0810)	AS
Py 12.1.011	Patrocínio, MG	5,56 (±0,8627)	MS	0,805 (±0,0815)	AS	0,214 (±0,0522)	AS
Py 12.1.077	Perdizes, MG	82,28 (±109,70)	I	0,605 (±0,1009)	AS	0,0006 (±0,00007)	AS
Py 12.1.041	Rio Verde, GO	>100,0 (±842,44)	I	1,001 (±0,1238)	AS	0,0004 (±0,0011)	AS
Py 12.1.054	Rio Verde, GO	0,632 (±0,0801)	AS	0,610 (±0,0853)	AS	0,004 (±0,0107)	AS
Py 12.1.115	Brasília, DF	>100,0 (±576,46)	I	0,692 (±0,0734)	AS	0,193 (±0,0689)	AS
Py 12.1.132	Amambai, MS	>100,0 (±17,574)	I	0,979(±0,0725)	AS	0,001 (±0,0033)	AS
Py 12.1.184	Aral Moreira, MS	39,62 (±37,38)	BS	0,495 (±0,0913)	AS	0,056 (±0,1322)	AS
Py 12.1.183	Dourados, MS	47,64 (±104,450)	BS	0,759 (±0,1199)	AS	0,298 (±0,2646)	AS

Py 12.1.247	Amambai, MS	18,82 (±14,79)	BS	0,485 (±0,1060)	AS	0,008 (±0,0131)	AS
Py 12.1.322	Aral Moreira, MS	>100,0 (±6,5300)	I	0,446 (±0,0776)	AS	0,031 (±0,0188)	AS
Py 12.1.319	Aral Moreira, MS	11,40 (±1,4394)	BS	0,630 (±0,1112)	AS	0,061 (±0,0030)	AS
Py 12.1.181	São L. Gonzaga, RS	71,38 (±123,17)	I	0,638 (±0,0850)	AS	0,087 (±0,1279)	AS
Py 12.1.209	São Borja, RS	>100,0 (±39,89)	I	0,617 (±0,0997)	AS	0,053 (±0,0321)	AS

^xSensibilidade de *Pyricularia oryzae* ao fungicida: CI50 < 1,0 mg L-1 Alta Sensibilidade (AS), CI50 entre 1,0 e 10,0 mg L-1 Moderada Sensibilidade (MS), CI50 entre 10,0 e 50,0 mg L-1 Baixa Sensibilidade (BS), CI50 > 50,0 mg L-1 Insensível (I). YErro padrão.

Tabela 4 - Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano e sensibilidade de *Magnaporthe oryzae* do trigo a fungicidas. Passo Fundo-RS, 2016

Isolado	Origem	Concentração inibitória (CI50 mg L ⁻¹)			S ^x
		Tebuconazol	Protioconazol	Protioconazol + trifloxistrobina	
Py12.0.012i	Londrina, PR	0,639 (±0,0774) ^y	0,040 (±0,0596) ^y	0,004 (±0,0039) ^y	AS
Py12.1.017i	Londrina, PR	0,403 (±0,0726)	0,001 (±0,0014)	0,005 (±0,0330)	AS
Py 12.1.298	Rolândia - PR	0,553 (±0,1324)	0,003 (±0,0044)	0,054 (±0,4939)	AS
Py 12.1.329	Londrina, PR	0,177 (±0,2919)	0,028 (±0,0983)	0,001 (±0,0012)	AS
Py 12.1.331	Londrina, PR	0,411 (±0,0708)	0,010 (±0,0062)	0,036 (±0,0208)	AS
Py 12.1.337	Londrina, PR	0,329 (±0,0901)	0,027 (±0,0174)	0,005 (±0,0032)	AS
Py12.1.029i	Itaí, SP	0,554 (±0,2550)	0,026 (±0,0491)	0,003 (±0,0003)	AS
Py 12.1.011	Patrocínio, MG	0,692 (±0,0857)	0,373 (±0,0735)	0,031 (±0,0582)	AS
Py 12.1.077	Perdizes, MG	0,553 (±0,0799)	0,210 (±0,1291)	0,027 (±0,0380)	AS
Py 12.1.041	Rio Verde, GO	0,423 (±0,0720)	0,002 (±0,0002)	0,109 (±0,0003)	AS
Py 12.1.054	Rio Verde, GO	0,649 (±0,0899)	0,016 (±0,0387)	0,013 (±0,0045)	AS
Py 12.1.115	Brasília, DF	0,775 (±0,1027)	0,174 (±0,4129)	0,003 (±0,0029)	AS
Py 12.1.132	Amambai, MS	0,553 (±0,0837)	0,469 (±0,1927)	0,002 (±0,0017)	AS

Py 12.1.1.184	Aral Moreira, MS	0,521 (±0,0800)	AS	0,023 (±0,0958)	AS	0,002 (±0,0014)	AS
Py 12.1.1.183	Dourados, MS	0,631 (±0,1206)	AS	0,157 (±0,0850)	AS	0,001 (±0,0027)	AS
Py 12.1.1.247	Amambai, MS	0,194 (±0,0921)	AS	0,071 (±0,0698)	AS	0,002 (±0,0015)	AS
Py 12.1.1.322	Aral Moreira, MS	0,354 (±0,0709)	AS	0,076 (±0,0311)	AS	0,002 (±0,0014)	AS
Py 12.1.1.319	Aral Moreira, MS	0,457 (±0,1144)	AS	0,051 (±0,0462)	AS	0,003 (±0,0031)	AS
Py 12.1.1.181	São L. Gonzaga, RS	0,738 (±0,1008)	AS	0,158 (±0,0493)	AS	0,004 (±0,0110)	AS
Py 12.1.1.209	São Borja, RS	0,568 (±0,1178)	AS	0,271 (±0,0879)	AS	0,301 (±0,1520)	AS

^xSensibilidade de *Pyricularia oryzae* ao fungicida: CI₅₀ < 1 mg L⁻¹ Alta Sensibilidade (AS), CI₅₀ entre 1 e 10 mg L⁻¹ Moderada Sensibilidade (MS), CI₅₀ entre 10 e 50 mg L⁻¹ Baixa Sensibilidade (BS), CI₅₀ > 50 mg L⁻¹ Insensível (I). ^yErro padrão

4 CONCLUSÕES

- a) A população amostrada de *M. oryzae* do trigo apresenta alteração de sensibilidade para a casugamicina.
- b) Os isolados de *M. oryzae* do trigo são altamente sensíveis para os fungicidas carbendazim, triciclazol, tebuconazol, protioconazol e protioconazol+trifloxistrobina.
- c) Aplicações alternadas de fungicidas de modo de ação diferentes devem ser utilizadas para preservar a alta sensibilidade encontrada para *M. oryzae*.
- d) O triciclazol apresenta potencial fungitóxico para *M. oryzae* do trigo, e o patógeno possivelmente sintetize melanina em seu apressório.
- e) Não foi possível estabelecer um isolado linha de base, selvagem, para estimar o fator de redução de sensibilidade. Mas os valores de CI_{50} obtidos podem servir como ponto de referência para monitoramento da sensibilidade de *M. oryzae* do trigo.

CAPÍTULO III

SENSIBILIDADE “*IN VITRO*” DE *Magnaporthe oryzae* DO TRIGO A FUNGICIDAS INIBIDORES DA DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS

CRISTINA BOARETTO¹

RESUMO – Uma das principais limitações para o cultivo do trigo no Brasil é a ocorrência de doenças causadas por fungos, dentre essas, a brusone, causada por *Magnaporthe oryzae*. Doença que vem ganhando destaque por causar danos de até 72,5%, e por apresentar difícil controle pela baixa eficiência dos fungicidas utilizados nas aplicações na parte aérea da planta. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a fungitoxicidade dos fungicidas trifloxistrobina, piraclostrobina+fluxapiraxade, mancozebe, azoxistrobina, do ácido salicílico-hidroxâmico (SHAM), e da mistura SHAM+o fungicida azoxistrobina, sobre a germinação de conídios de *M. oryzae*. Os fungicidas foram acrescentados ao meio BDA, nas concentrações de 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 100,00 mg L⁻¹, e a fungitoxicidade dos produtos foi determinada por meio da CI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da germinação dos conídios), e classificada de acordo com os níveis de sensibilidade. O modelo estatístico que melhor se ajustou aos dados obtidos foi o de

¹ Eng^a. Agr^a., mestrande do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, bolsista CAPES/Embrapa, Projeto “*Magnaporthe oryzae*: O desafio da tropicalização do trigo no Brasil.”

Weillbull, com três parâmetros. Os fungicidas mancozebe e a mistura de piraclostrobina + fluxapiróxade apresentaram a maior fungitoxicidade. Dezenove isolados apresentaram insensibilidade a azoxistrobina. Ocorreu resistência cruzada para os fungicidas azoxistrobina e trifloxistrobina. O SHAM apresentou potencial fungitóxico para *M. oryzae*.

Palavras-chave: brusone, *Triticum aestivum*, fungitoxicidade.

WHEAT *Magnaporthe oryzae* “IN VITRO” SENSITIVITY TO FUNGICIDES THAT INHIBIT CONIDIA GROWTH

ABSTRACT - A major limitation for wheat cultivation in Brazil is the occurrence of fungal diseases, among these, the blast caused by *Magnaporthe oryzae*. Disease that has been gaining attention for causing damages of up to 72,5%, and for presenting difficulty to control by the low efficiency of fungicides used in applications in the aerial part of the plant. This work aimed to evaluate the toxicity of trifloxystrobin fungicides, pyraclostrobin+fluxapyroxad, mancozeb, azoxystrobin, the salicyl hydroxamic acid (SHAM), and the mixture SHAM + the fungicide azoxystrobin, on the germination of conidia of *M. oryzae*. The fungicides were incorporated into PDA medium at concentrations of 0.00; 0.01; 0.10; 1.00; 10.00 and 100.00 mg L⁻¹, and the toxicity of the products was determined by means of EC₅₀ (concentration necessary to inhibit 50% of germinated conidia) and classified according to levels of sensitivity. The statistical model that best

fit the data obtained was the Weibull modulus with three parameters. The fungicide mancozeb and the mixture of pyraclostrobin+fluxapyroxad showed the highest fungitoxicity. Nineteen isolates showed insensitivity azoxystrobin. Was cross-resistance to azoxystrobin and trifloxystrobin fungicides. The SHAM showed fungitoxic potential for *M. oryzae*.

Key words: blast, *Triticum aestivum*, fungus toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O agente causal da brusone, *Maganpothe oryzae*, pode ser encontrado parasitando inúmeros hospedeiros, principalmente as espécies pertencentes à família Poaceae (OU, 1985). Entretanto a doença é mais conhecida por ocasionar danos em cereais como arroz (*Oryza sativa* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.).

As medidas de controle disponíveis para reduzir os danos da brusone a níveis sub-econômicos na cultura do trigo, são: a utilização de cultivares que apresentam algum nível de tolerância à doença, o escalonamento da semeadura e de cultivares, e as aplicações de fungicidas na parte aérea. O foco é proteger a cultura durante a fase de espigamento para evitar que o sítio de infecção fique desprotegido (REUNIÃO, 2014).

O controle químico é realizado, principalmente, pela utilização de produtos químicos na forma isolada ou em misturas (triazóis e estrobilurinas) (KOHLI et al., 2011, MACIEL et al., 2011; MACIEL et al., 2014). Dentre as

dificuldades encontradas na utilização do controle químico, estão a baixa eficiência dos fungicidas utilizados nas aplicações de parte aérea da planta (ROCHA et al., 2014), e a existência de populações de *M. oryzae* resistentes às estrobilurinas. Esta resistência, foi atribuída a uma mutação G143A ocorrente no gene do citocromo b (CASTROAGUDIN et al., 2015). Neste mesmo trabalho, os autores relataram que no Brasil entre os anos de 2005 a 2012, a frequência desta mutação nas populações de *M. oryzae* que infectam o trigo aumentou 54%.

Quanto ao mecanismo de ação das estrobilurinas, são também conhecidas como inibidores da quinona externa (fungicidas IQe), pois bloqueiam a transferência de elétrons do citocromo b para o c_1 no sítio Q_e , comprometendo negativamente a produção de adenosina trifosfato (ATP) e com isso a respiração do patógeno no Complexo III, das organelas mitocondriais (AVILA-ADAME & KÖLLER, 2003, REIS et al., 2010, PARREIRA et al., 2009). Além disso, Oliveira et al. (2015) estudando a existência de resistência cruzada entre os fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina, descreveram que isolados que apresentavam a mutação G143A no gene *cyt b* foram 42 vezes mais resistentes à piraclostrobina. Os estudos da alteração da sensibilidade de populações de fungos a fungicidas vêm sendo desenvolvidos há algum tempo em diferentes patossistemas e em diversos países. Nos Estados Unidos, a ocorrência de populações de *M. oryzae* do azevém perene com resistência a azoxistrobina foi relatada em diferentes regiões do país (MA et al., 2009). O agente causal da septoriose em trigo o fungo *Septoria tritici* Rob. ex Desm. [teleomorfo:

Mycosphaerella graminicola (Fuckel) Schroeter], apresentou resistência a fungicidas pertencentes às estrobilurinas, no Reino Unido em 2001. A partir disso, os relatos evoluíram durante as safras seguintes, chegando a resistência até o Norte da Europa (TORRIANI et al., 2009; BEYER et al., 2011).

Um segundo mecanismo associado à resistência das estrobilurinas, envolve a atividade de uma enzima oxidase alternativa (AOX-Mg), identificado *in vitro* para vários fungos, como *Septoria tritici*, *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis*, *Fusarium graminearum* e *Pyricularia oryzae* (KIM et al., 2003; OLIVEIRA, 2014; RODRÍGUEZ, 2014), que quando ativa tem por função continuar produzindo ATP (transformando oxigênio em água e oxidando ubiquinona) mesmo na presença de inibidores da via principal como as estrobilurinas. Logo, a adição do ácido salicil-hidroxiâmico (SHAM) à estrobilurina para teste *in vitro* minimiza o efeito dessa rota oxidativa alterna, e se tem a real sensibilidade do patógeno ao grupo químico em questão.

As carboxamidas apesar do uso recente em misturas com as estrobilurinas, estão no mercado desde 1960 (REIS et al., 2010), no entanto não há trabalhos de fungitoxicidade para *M. oryzae*, bem como, poucos são os estudos com fungicidas multissítio para o controle da brusone do trigo. Seu mecanismo de ação é muito parecido com as estrobilurinas, mas atuando na transferência de elétrons no complexo II das mitocôndrias (REIS et al., 2010). Os multissítios, como o mancozebe, tem seu uso na agricultura a mais de cinquenta anos, sem haver descrição de resistência para o mesmo, isso porque ele apresenta um largo

espectro atuando em vários sítios vitais dos fitopatógenos (REIS & REIS, 2015). A ocorrência de populações de patógenos com alteração da sensibilidade a fungicidas pode estar ligada ao mecanismo de ação dos fungicidas, a formação e adaptação da raça do fungo resistente, a taxa de desenvolvimento do fungo, a disseminação dos propágulos, e a pressão de seleção (STAUB & SOZZI, 1984, ZHANG et al., 2004). A quantificação da sensibilidade de uma população de fungos a um fungicida pode ser feita *in vivo* ou *in vitro*, e é medida pela fungitoxicidade da substância química, estimada pela concentração inibitória (CI_{50}), ou seja, a quantidade de ingrediente ativo necessária para controlar 50% da germinação dos esporos, do crescimento miceliano, ou do número de urédias, etc. Por questões de representatividade e confiabilidade de resultados, deve-se utilizar no mínimo 20 isolados do fungo (RUSSEL, 2004). Edgington et al. (1971), propõem os seguintes critérios para classificar a toxicidade de um fungicida: $CI_{50} < 1 \text{ mg/L}$ = fungicida altamente fungitóxico e isolado altamente sensível; CI_{50} entre 1 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} = fungicida moderadamente fungitóxico e isolado moderadamente sensível; e $CI_{50} > 50 \text{ mg L}^{-1}$ = fungicida não tóxico e isolado insensível.

São frequentes os relatos por produtores, da ineficácia dos fungicidas no controle químico da brusone em trigo, e ainda, há a falta de informações sobre a fungitoxicidade da maioria dos princípios ativos. Com isso, o presente trabalho objetivou determinar *in vitro*, a sensibilidade da germinação de conídios de *M. oryzae* do trigo, a diferentes produtos químicos, e gerar seus valores de CI_{50} .

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas instalações da Embrapa Trigo, em Passo Fundo - RS. A preparação dos meios de cultura, solubilização dos ingredientes ativos aos meios, obtenção do inóculo e desenvolvimento das colônias do fungo foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia.

As placas de Petri novas (60 mm de diâmetro x 10 mm de altura) utilizadas no experimento, após o primeiro uso, foram higienizadas e esterilizadas por no mínimo 30 dias com formaldeído (formol 37% - Quimicamar[®]) a vapor (REIS, 2013), para a realização do ensaio em duplicata.

Os isolados monospóricos utilizados foram obtidos de espigas de trigo sintomáticas e folhas de braquiária que apresentavam lesões características da brusone. Cada cepa do fungo estava preservada em papel filtro, acondicionado em tubos do tipo criotubo em temperatura de -20 °C. As colônias puras do fungo foram cultivadas em meio de ágar-aveia (1,0 L água destilada + 60 g de farinha de aveia + 15 g de ágar) por 15 dias em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura em torno de 25 °C ± 2 °C.

Após esse período, procedeu-se com a obtenção da suspensão de esporos, com a raspagem sobre o micélio da colônia pura do fungo crescida na placa de Petri. Utilizou-se um pincel e água destilada contendo espalhante adesivo Tween 80 (uma gota L⁻¹). Para ajustar a suspensão de conídios desejada de 3,5 x 10⁴ esporos mL⁻¹ (MA et al., 2009) foi utilizado uma câmara de Neubauer (Loptik Labor 0,0025 mm²).

A escolha dos isolados foi realizada levando em consideração os principais estados produtores de trigo no Brasil. Foram utilizados 19 isolados obtidos de espigas de trigo, e um isolado obtido de folha de braquiária (Tabela 1).

Tabela 1- Identificação e origem dos isolados de *Magnaporthe oryzae*. Passo Fundo-RS, 2016

Identificação	Hospedeiro/ cultivar	Coordenadas	Local de coleta	Data da coleta
Py 12.0.012i	Braquiária	S 23°18'00,7" - WO 51°16'42,2"	Londrina, PR	2012
Py 12.1.017i	CD 104	S 23°18'02,2" - WO 51°16'43,4"	Londrina, PR	2012
Py 12.1.298	Mirante	S 23°20'03,0" - WO 51°17'43,0"	Rolândia - PR	2012
Py 12.1.329	CD 104	S 23°17'51,6" - WO 51°06'18,1"	Londrina, PR	2012
Py 12.1.331	Mirante	S 23°13'42,3" - WO 51°15'40,5"	Londrina, PR	2012
Py 12.1.337	Marfim	S 23°11'44,0" - WO 51°14'30,4"	Londrina, PR	2012
Py 12.1.029i	CD 116	S 23°33'08,8" - WO 49°03'24,9"	Itaí, SP	2012
Py 12.1.011	BRS 264	S 19°02'15,2" - W 47°05'55,6"	Patrocínio, MG	2012
Py 12.1.077	BR 18	S 19°18'29,8" - W 47°26'15,9"	Perdizes, MG	2012
Py 12.1.041	BR 18	S 17°37'26,2" - W 51°04'11,4"	Rio Verde, GO	2012
Py 12.1.054	BR 18	S 17°50'25,4" - W 51°11'00,5"	Rio Verde, GO	2012
Py 12.1.115	BR 264	S 16°01'23,4" - W 47°37'50,9"	Brasília, DF	2012
Py 12.1.132	BRS Guamirim	S 23°02'06,9" - WO 55°16'59,3"	Amambai, MS	2012
Py 12.1.184	Trigo	S 22°57'38,3" - WO 55°19'58,4"	Aral Moreira, MS	2012
Py 12.1.183	Trigo	S 22°19'26,6" - WO 54°49'08,1"	Dourados, MS	2012
Py 12.1.247	BRS 208	S 23°00'20,1" - WO 55°23'02,8"	Amambai, MS	2012
Py 12.1.322	IPR 85	S 23°02'02,8" - WO 55°25'16,9"	Aral Moreira, MS	2012

Py 12.1.319	IPR 85	S 22°49'27,2"- WO 55°16'52,5"	Aral Moreira, MS	2012
Py 12.1.181	PF 070475	S -28°24'47,4" WO 54°45'48,7"	São Luiz Gonzaga, RS	2012
Py 12.1.209	PF 090702	S -28°41'50,7"- WO 55°57'57,2"	São Borja, RS	2012

Os produtos químicos utilizados foram: mancozebe, azoxistrobina, trifloxistrobina, piraclostrobina+fluxapiróxade, ácido salicílhidroxiâmico (SHAM), e SHAM+azoxistrobina (Tabela 2). A seleção dos mesmos se deu devido aos relatos de ocorrência de resistência às estrobilurinas e a influência do SHAM neste contexto, e a possibilidade do uso de princípios ativos para estratégias antirresistência.

Para avaliar a fungitoxicidade dos fungicidas sobre a germinação dos conídios dos isolados de *M. oryzae*, utilizou-se a metodologia da adição dos ingredientes ativos de cada fungicida ao meio de cultura ágar-água (RUSSEL, 2004). Foram testadas as concentrações 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 100,00 mg L⁻¹ para cada fungicida. A testemunha foi considerada o meio que não recebeu a solubilização de fungicida, ou seja, a concentração 0,00 mg L⁻¹.

Tabela 2- Ingredientes ativos utilizados para determinar a sensibilidade de conídios, *in vitro*, de 20 isolados de *Maganporthe oryzae*. Passo Fundo-RS, 2016

Ingrediente ativo	Formulação comercial	Concentração do ingrediente ativo	Grupo químico
Azoxistrobina	Priori SC [®]	250 g L ⁻¹	Estrobirulina
Trifloxistrobina	Twist CE [®]	125 g L ⁻¹	Estrobirulina
Piraclostrobina+ Fluxapiróxade	Orkestra [®]	333 g L ⁻¹ + 167 g L ⁻¹	Estrobirulina+ Carboxamida

Mancozebe		Unizeb Gold [®]	750 g kg ⁻¹	Ditiocarbamato
Ácido salicílhidroxiâmico (SHAM)		Sigma Aldrich [®]	100 µg L ⁻¹	Hidroxilamina
SHAM Azoxistrobina	+	Sigma Aldrich [®] Priori SC [®]	100 µg L ⁻¹ + 250 L ⁻¹	Hidroxilamina+ estrobirulina

O preparo das suspensões das diferentes concentrações de fungicidas foi realizada pipetando-se uma alíquota do fungicida à um balão volumétrico com água destilada e esterilizada, totalizando um volume final de 100 mL (solução estoque um). Em seguida, retirou-se dessa solução 1,0 mL e transferiu-se para um balão com 99,0 mL de água destilada e esterilizada, formando a solução estoque dois (AVOZANI et al., 2014). Após a autoclavagem e resfriamento do meio de cultura ágar-água até 40 °C, as soluções estoque foram adicionadas ao meio, e vertidas em placas de Petri.

Após a solidificação do meio, com o auxílio de uma micropipeta foram transferidos 300 µL das suspensões dos esporos para as placas com o meio de cultura suplementado com as diferentes concentrações dos fungicidas. As placas foram incubadas em câmara com demanda biológica de oxigênio (DBO) (Eletrolab[®]) em temperatura de 23 ± 2 °C e luz contínua, fornecida por lâmpadas fluorescentes Osram de 40 W com intensidade de 2.150 lux, ficando neste regime por 16 horas de acordo com Ma et al. (2009) para a germinação dos conídios. Seguiu-se com a interrupção do desenvolvimento do tubo germinativo com a adição de três gotas de acetona 100 %

(Synth[®]) por placa, misturadas com um corante a base de azul de algodão.

As avaliações foram realizadas por contagem de varredura em microscópio ótico (Nikon Eclipse E 200) no aumento de 40x. Com o auxílio de dois contadores manuais registrou-se o número de esporos germinados e de não germinados, até o somatório de ambos ser igual a 100 esporos. Para cada isolado avaliou-se seis concentrações de fungicida, e para cada concentração de fungicida foram realizadas quatro repetições (placas) com a contagem de 100 esporos por placa. Foi considerado germinado os conídios que apresentavam o comprimento do tubo germinativo de tamanho igual ou maior ao menor diâmetro do conídio (ZADOKS & SCHEIN, 1979).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído de sete tratamentos e quatro repetições. Cada experimento teve uma repetição no tempo. Para a determinação da CI_{50} , os dados foram submetidos ao modelo de Weibull equação três $Y = d \exp(-\exp(b(\log x - e)))$, descrito por Knezevic et al. (2007), utilizando o programa R ((R Core Team (2015). Para Y considerou-se o número de esporos germinados, para X, as diferentes doses dos fungicidas, e para d, b, e, os parâmetros da equação da distribuição de Weibull. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL [http://www.R-project.org/.](http://www.R-project.org/)) para a análise dos dados, com o pacote DRC que contém o procedimento Probit.

Para classificar a sensibilidade em grupos foi utilizado uma escala proposta por Edgington et al. (1971), com

modificações, considerando-se como: Alta Sensibilidade (AS) os isolados com $CI_{50} < 1,0 \text{ mg L}^{-1}$; Moderada Sensibilidade (MS) os isolados de CI_{50} entre 1,0 e 10,0 mg L^{-1} ; Baixa Sensibilidade (BS) os isolados de CI_{50} entre 10,0 e 50,0 mg L^{-1} ; e Insensível (I) os isolados de $CI_{50} > 50,0 \text{ mg L}^{-1}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de sensibilidade dos isolados de *M. oryzae* amostrados, representativos de seis estados produtores de trigo no Brasil, apresentaram níveis distintos de sensibilidade para os produtos químicos testados (Tabelas 3 e 4). Devido a ocorrência de valores de CI_{50} entre 10,0 e 50,0 mg L^{-1} , incluiu-se esse nível de sensibilidade na escala proposta por Edington et al. (1971), considerando como baixa sensibilidade (BS).

Em relação aos isolados testados com o ingrediente ativo trifloxistrobina os valores de CI_{50} variam de 0,0001 a $> 100 \text{ mg L}^{-1}$. Os níveis de sensibilidade foram agrupados em AS, MS, BS e I (Tabela 3). Dentre os 20 isolados estudados, todos os estados apresentaram isolados com alteração de sensibilidade, ou seja, com $CI_{50} > 1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Os seis isolados oriundos do Paraná apresentaram alteração de sensibilidade para trifloxistrobina. E, os isolados obtidos dos estados de Minas Gerais, Goiás e Rio Grande do Sul, chamaram atenção pelo fato de terem sido classificados desde insensíveis até altamente sensíveis. O estado do Mato Grosso do Sul foi o que apresentou maior número de isolados com alta sensibilidade. Essa diferença se acredita ser um reflexo das tecnologias envolvidas no cultivo

do trigo. Em locais como o estado do Paraná, responsável por aproximadamente 20% da produção do cereal no país (CONAB, 2015), o uso do controle químico é altamente difundido, logo a pressão de seleção sobre o patógeno é superior e pode ter levado à perda de fungitoxicidade do produto químico em questão. Entretanto, no estado do Mato Grosso do Sul, em que o cultivo não é tão representativo, apenas 7,6% (CONAB, 2015) do total produzido, o controle químico parece não estar comprometido, ainda. Chamou atenção dois isolados, Py 12.1.054 e Py 12.1.04, ambos de Goiás, que foram coletados a uma distância geodésica de somente 26.803 m, e apresentaram respectivamente, alta sensibilidade e insensibilidade para a trifloxistrobina. Dificultando ainda mais, a recomendação de produtos químicos para o controle da doença.

A mistura comercial piraclostrobina+fluxapiróxade apresentou para os isolados os valores mínimos e máximos de CI_{50} de 0,02 e 20,2 mg L⁻¹, logo, com nenhum valor acima de 50,0 mg L⁻¹ tem-se que nenhum isolado classificou-se como I. Apenas dois isolados, Py 12.1.298 e Py 12.1.337, ambos do Paraná, mostraram-se com baixa sensibilidade a mistura (Tabela 3). Pelo fato de não terem sido testados separadamente os ingredientes ativos, não se pode atribuir a carboxamida presente na mistura, todo o efeito tóxico sobre a germinação de *P. oryzae*. Entretanto, considerando que as estrobilurinas apresentam resistência cruzada, e 95% dos isolados estudados foram insensíveis para a azoxistrobina (Tabela 4), pode-se inferir, que há possibilidade da carboxamida ser o princípio ativo fungitóxico nesta mistura.

O mancozebe apresentou os níveis de CI_{50} mais baixos dentre os fungicidas testados, variou de 0,00003 a 2,55 mg L⁻¹. Apenas quatro isolados foram classificados como moderadamente sensíveis, e o restante (16) como altamente sensíveis. A sua ação fungistática não foi testada, no entanto mostrou-se um potente inibidor da germinação e pode ser estratégico utilizá-lo com estrobilurinas (sítio específico) que ainda não apresentem resistência, a fim de tentar prolongar a vida útil desses compostos. Dados de fungitoxicidade para o fungicida mancozebe na literatura, até o presente momento, inexistem, entretanto, resultados de ensaios cooperativos, para avaliar a eficiência de produtos para o controle da brusone a campo, indicaram que a mistura entre mancozebe+tiofanato metílico apresentou os melhores resultados (SANTANA et al., 2013).

De acordo com Mikaberidze et al. (2013), o uso das estrobilurinas em misturas devem levar em consideração o custo adaptativo da resistência a fungicidas. Tem que se determinar o resultado da competição entre as estirpes sensíveis e resistentes do patógeno. Se houver um custo adaptativo, uma proporção ideal do fungicida de alto risco na mistura pode ser utilizada, e espera-se que no processo de seleção natural as linhagens resistentes desapareçam e o nível de controle de restabeleça. Se não existir custo adaptativo, a utilização de um fungicida de alto risco selecionará os naturalmente resistentes e o fungicida de alto risco se torna não funcional de forma irreversível.

Em relação ao fungicida azoxistrobina, apenas o isolado Py 12.1.247, de Amambaí-MS, apresentou alta

sensibilidade ao produto. Os isolados de Rolândia-PR (Py 12.1.298) e de Amambaí-MS (Py 12.1.132) puderam ser classificados como BS, e os demais isolados todos como I (Tabela 4). Este resultado era esperado, uma vez que estudos genéticos vem comprovando a resistência genética de populações de *M. oryzae* a azoxistrobina. Especificamente para *M. oryzae* do trigo, em 2005, 36% da população do patógeno mostrava-se resistente a azoxistrobina, e 2012 este percentual foi para 90% na população amostrada (CASTROAGUDIN, 2015).

Tabela 3. Concentração inibitória de 50% da germinação de conídios e sensibilidade de *Magnaporthe oryzae* do trigo a fungicidas. Passo Fundo-RS, 2016

Isolado	Origem	Concentração inibitória (CI ₅₀ mg L ⁻¹)					
		Trifloxistrobina	S ^x	Piraclostrobina+ Fluxapiroxade	S ^x	Mancozebe	S ^x
Py12.0.012i	Londrina, PR	34,7 (±10,3)	BS	4,19 (±1,19)	MS	2,55 (±0,58)	MS
Py12.1.017i	Londrina, PR	6,85 (±1,57)	MS	0,03 (±0,006)	AS	0,00003 (±0,00001)	AS
Py 12.1.298	Rolândia, PR	22,9 (±5,20)	BS	16,6 (±2,41)	BS	0,03 (±0,02)	AS
Py 12.1.329	Londrina, PR	11,9 (±3,57)	BS	0,85 (±0,12)	AS	0,02 (±0,005)	AS
Py 12.1.331	Londrina, PR	>100 (±1778)	I	6,40 (±0,74)	MS	0,14 (±0,06)	AS
Py 12.1.337	Londrina, PR	>100 (±2407)	I	20,2 (±2,80)	BS	0,005 (±0,003)	AS
Py12.1.029i	Itaí, SP	24,2 (±4,01)	BS	0,17 (±0,03)	AS	0,004 (±0,001)	AS
Py 12.1.011	Patrocínio, MG	32,7 (±20,7)	BS	2,87 (±0,38)	MS	0,006 (±0,003)	AS
Py 12.1.077	Perdizes, MG	0,001(±0,01)	AS	0,97 (±0,0001)	AS	1,36 (±0,32)	MS
Py 12.1.041	Rio Verde, GO	>100 (±1045,6)	I	0,36 (±0,067)	AS	0,005 (±0,002)	AS
Py 12.1.054	Rio Verde, GO	0,0001 (±0,01)	AS	3,33 (±1,35)	MS	0,09 (±0,07)	AS
Py 12.1.115	Brasília, DF	0,001 (±0,01)	AS	1,98 (±0,96)	MS	0,08 (±0,06)	AS
Py 12.1.132	Amambai, MS	0,26 (±0,09)	AS	0,04 (±0,01)	AS	1,83 (±0,25)	MS
Py 12.1.184	Aral Moreira, MS	6,57 (±2,23)	MS	1,18 (±0,23)	MS	0,22 (±0,07)	AS

Py 12.1.183	Dourados, MS	0,02 (±0,01)	AS	0,45 (±0,07)	AS	0,001 (±0,01)	AS
Py 12.1.247	Amambai, MS	0,0006(±0,0003)	AS	0,02 (±0,01)	AS	1,56 (±3,01)	MS
Py 12.1.322	Aral Moreira, MS	0,21 (±0,007)	AS	1,07 (±0,15)	MS	0,15 (±0,03)	AS
Py 12.1.319	Aral Moreira, MS	21,8 (±4,53)	BS	3,11 (±0,62)	MS	0,13 (±0,04)	AS
Py 12.1.181	São L. Gonzaga, RS	0,006 (±0,003)	AS	1,11 (±0,02)	MS	0,003 (±0,001)	AS
Py 12.1.209	São Borja, RS	>100 (±1375)	I	3,05 (±0,61)	MS	0,31 (±0,10)	AS

^xSensibilidade de *Pyricularia oryzae* ao fungicida: CI₅₀ < 1,0 mg L⁻¹ Alta Sensibilidade (AS), CI₅₀ entre 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ Moderada Sensibilidade (MS), CI₅₀ entre 10,0 e 50,0 mg L⁻¹ Baixa Sensibilidade (BS), CI₅₀ > 50,0 mg L⁻¹ Insensível (I). ^yErro padrão.

Em contrapartida, ao se estudar o efeito sobre a germinação de esporos, da mistura azoxistrobina+ácido salicilhidroxâmico, e também do ácido salicilhidroxâmico isolado, os valores de CI_{50} mudaram, e os níveis de sensibilidade foram alterados de insensíveis para baixa e moderada sensibilidade (Tabela 4). Isso mostrou que o uso da azoxistrobina de forma isolada não bloqueou por completo a transferência de elétrons na cadeia respiratória e o patógeno assegurou a sua sobrevivência através de rotas alternativas. Trabalhos utilizando o SHAM demonstraram a capacidade fitotóxica deste composto em algumas espécies de fungos. Em 2012, a utilização do SHAM ganhou destaque no Brasil, com a descoberta do efeito fungitóxico deste composto, no fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa* agente causal da vassoura-de-bruxa no cacau. No estudo os pesquisadores trabalharam com o patógeno nas fases necrotróficas e biotróficas, utilizando o fungicida azoxistrobina, inibidor da via respiratória principal, e o SHAM, inibidor da via alternativa. Somente com a utilização de ambos foi possível controlar o fungo nas duas fases (THOMAZELLA et al., 2012).

Tabela 4 - Concentração inibitória de 50% da germinação de conídios e sensibilidade de *Magnaporthe oryzae* do trigo a fungicidas. Passo Fundo-RS, 2016

Isolado	Origem	Azoxistrobina		Ácido salicililhidroxâmico (SHAM)		SHAM + Azoxistrobina		S ^x
		S ^x	Concentração inibitória (CI ₅₀ , mg L ⁻¹)	S ^x	Concentração inibitória (CI ₅₀ , mg L ⁻¹)	S ^x	Concentração inibitória (CI ₅₀ , mg L ⁻¹)	
Py12.0.012i	Londrina, PR	I	>100 (±4559) ^y	I	19,3 (±3,68)	BS	19,5 (±3,68)	BS
Py12.1.017i	Londrina, PR	I	>100 (±50,7)	I	12,0 (±3,59)	BS	11,6 (±2,16)	BS
Py 12.1.298	Rolândia - PR	BS	38,7 (±10,1)	BS	8,51 (±1,80)	MS	4,50 (±1,09)	MS
Py 12.1.329	Londrina, PR	I	>100 (±146,8)	I	32,9 (±18,5)	BS	23,4 (±4,30)	BS
Py 12.1.331	Londrina, PR	I	>100 (±1395)	I	11,7 (±8,06)	BS	21,6 (±2,70)	BS
Py 12.1.337	Londrina, PR	I	>100 (±110,7)	I	21,6 (±2,74)	BS	16,5 (±2,05)	BS
Py12.1.029i	Itaí, SP	I	>100 (±1723)	I	11,7 (±1,36)	BS	12,1 (±1,30)	BS
Py 12.1.011	Patrocínio, MG	I	>100 (±6855)	I	17,7 (±2,30)	BS	12,5 (±1,33)	BS
Py 12.1.077	Perdizes, MG	I	>100 (±114,7)	I	11,9 (±2,10)	BS	10,6 (±1,89)	BS
Py 12.1.041	Rio Verde, GO	I	>100 (±295)	I	17,8 (±8,16)	BS	77,1 (±9,87)	I
Py 12.1.054	Rio Verde, GO	I	>100 (±90,9)	I	18,7 (±5,23)	BS	16,6 (±4,59)	BS
Py 12.1.115	Brasília, DF	I	>100 (±1708)	I	7,46 (±2,09)	MS	7,63 (±2,34)	MS
Py 12.1.132	Amambai, MS	BS	46,6 (±12,8)	BS	21,5 (±3,30)	BS	4,52 (±1,20)	MS
Py 12.1.184	Aral Moreira, MS	I	>100 (±1201)	I	11,6 (±1,60)	BS	12,9 (±1,77)	BS

Py 12.1.183	Dourados, MS	>100 (±46,0)	I	11,6 (±2,52)	BS	5,61 (±1,35)	MS
Py 12.1.247	Amambai, MS	0,04 (±0,79)	AS	3,76 (±1,28)	MS	1,42 (±0,60)	MS
Py 12.1.322	Aral Moreira, MS	>100 (±488)	I	21,6 (±2,55)	BS	21,9 (±2,40)	BS
Py 12.1.319	Aral Moreira, MS	59,1 (±18,8)	I	12,7 (±1,66)	BS	8,99 (±1,61)	MS
Py 12.1.181	São L. GonzagaRS	>100 (±5272)	I	16,7 (±1,97)	BS	17,8 (±2,14)	BS
Py 12.1.209	São Borjã, RS	>100 (±449)	I	61,5 (±9,95)	I	46,5 (±9,96)	BS

^xSensibilidade de *Pyricularia oryzae* ao fungicida: CI₅₀ < 1,0 mg L⁻¹ Alta Sensibilidade (AS), CI₅₀ entre 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ Moderada Sensibilidade (MS), CI₅₀ entre 10,0 e 50,0 mg L⁻¹ Baixa Sensibilidade (BS), CI₅₀ > 50,0 mg L⁻¹ Insensível (I). ^yErro padrão.

Em 2014, no México, estudos com as espécies *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* e *F. poae*, agentes causais das podridões da espiga do milho, o SHAM foi adicionado ao fungicida piraclostrobina para minimizar os efeitos da rota oxidativa alterna, e se ter a real sensibilidade do patógeno a estrobilurina. Isso porque estudos anteriores mostravam resistência natural de *Fusarium graminearum*, isolado do trigo do Canadá, da Bélgica e da Alemanha, a trifloxistrobina, sem adição de SHAM (RODRIGUEZ, 2014). Assim como alguns fungicidas apresentam aspectos a serem superados, o inconveniente do SHAM é a sua instabilidade química, degradando facilmente (ALMEIDA, 2014). Em contrapartida, a dificuldade de controle da brusone do trigo necessita de novos meios que auxiliem o desenvolvimento de novos fármacos.

O isolado de braquiária Py 12.1.012i, que se acreditava ser um isolado selvagem, e que poderia ser usado para o cálculo do fator de redução da sensibilidade, apresentou alteração da sensibilidade para todos os fungicidas testados, inclusive para azoxistrobina. Segundo Reis et al. (2010), o isolado selvagem é uma pequena parte da linhagem ou população do fungo, que ainda apresenta ser sensível antes do uso de fungicidas para seu controle. Castroagudin et al. (2015), descreveram que mesmo isolados de *M. oryzae* encontrados infectando poáceas invasoras no entorno ou dentro de lavouras de trigo apresentaram a mutação G143A, que ocasiona resistência a alguns fungicidas pertencentes ao grupo das estrobilurinas. Danelli (2015), testando a hipótese da existência

de grupos de virulência em populações de *M. oryzae* do trigo e de poáceas invasoras, relatou a ocorrência de isolados destas duas espécies formando um grupo de virulência muito similar, que foi patogênico em todas as cultivares que formavam a série diferenciadora de raças, sendo que um dos isolados pertencentes a este grupo era o Py 12.1.012i de braquiária, o mesmo utilizado no presente trabalho.

Os isolados Py 12.1.331, Py 12.1.337 de Londrina - PR, Py 12.1.041 de Rio Verde - GO e Py12.1.209 de São Borja – RS, apresentaram resistência cruzada para a azoxistrobina e trifloxistrobina (Tabela 3 e 4). A resistência cruzada, ocorre quando a população do patógeno que desenvolveu resistência a um fungicida, tornam-se ao mesmo tempo resistentes a outros fungicidas que são afetados pela mesma mutação gênica e pelo mesmo mecanismo de resistência (FRAC, 2012).

Segundo Ghini & Kimati (2000), a azoxistrobina, a trifloxistrobina e a piraclostrobinas são as estrobirulinas que podem apresentar resistência cruzada. No caso da piraclostrobinas não foi possível detectar este fenômeno, pois foi utilizado uma mistura comercial que apresentava uma carboxamida, entretanto, Oliveira et al. (2015) relataram a ocorrência de resistência cruzada em isolados de *M. oryzae* do trigo para os fungicidas azoxistrobina e piraclostrobinas.

As falhas no controle químico de fitopatógenos, causadas pela redução da sensibilidade a ingredientes ativos, utilizados em aplicações no campo, envolve uma característica intrínseca dos microrganismos, a capacidade de adaptação a condições adversas de ambiente, podendo com isso sobreviver.

A utilização de fungicidas para o controle de fungos constitui numa mudança de ambiente para o patógeno que antes era sensível a um determinado ingrediente ativo, e que agora se adaptou a uma nova situação (REIS et al., 2010). O uso de cultivares resistentes em muitos patossistemas é considerado o método ideal de controle, mas na cultura do trigo, genótipos com essa característica, ou que apresentem graus de tolerância para a brusone, são limitados (URASHIMA et al., 2004; MACIEL et al., 2008). Nesse caso, o manejo químico da brusone do trigo se torna extremamente importante, mas o que se percebe é a ineficácia de fungicidas pelo desconhecimento de aspectos importantes como a biologia do patógeno e às dificuldades de proteção da espiga (OLIVEIRA et al., 2015).

4 CONCLUSÕES

- a) Os isolados amostrados de *M. oryzae* do trigo apresentam perda generalizada da sensibilidade ao fungicida azoxistrobina.
- b) Alguns isolados da população de *M. oryzae* amostrada possuem resistência cruzada aos fungicidas azoxistrobina e trifloxistrobina.
- c) Aplicações alternadas de fungicidas com mecanismos de ação diferentes devem ser utilizadas para manejar a resistência nas áreas onde o patógeno ainda apresenta sensibilidade preservada.
- d) O ácido salicilhidroxâmico apresenta potencial fungitóxico para *M. oryzae* do trigo *in vitro*.
- e) Não foi possível estabelecer um isolado linha de base, selvagem, para estimar o fator de redução de sensibilidade, mas

os valores de CI_{50} obtidos podem servir como ponto de referência para o monitoramento da sensibilidade de *M. oryzae* do trigo.

CAPÍTULO IV

DEPOSIÇÃO DE CALDA EM ESPIGAS ARTIFICIAIS POR TRÊS PONTAS DE PULVERIZAÇÃO EM APLICAÇÃO DE FUNGICIDA PARA O CONTROLE DA BRUSONE DO TRIGO

CRISTINA BOARETTO¹

RESUMO – A brusone do trigo é sintomática em todos os órgãos aéreos da planta, mas é na espiga que há o comprometimento da produtividade. O controle químico ainda é a principal estratégia de manejo, mas necessita de estudos que visem a melhor proteção da espiga. Com isso, objetivou-se avaliar a deposição da calda proporcionada por três pontas de pulverização com três volumes de calda diferentes, no controle da brusone do trigo. O fungicida utilizado foi o prothioconazol+trifloxistrobina+óleo vegetal Áureo[®], e as pontas e volumes de aplicação foram: jato cônico vazio (JA 1 - 100 L ha⁻¹); jato plano duplo (DB 110015 - 150 L ha⁻¹) e jato plano duplo (TJ60 11002 - 200 L ha⁻¹). Avaliou-se a severidade da doença em plantas de trigo inoculadas artificialmente em laboratório, e o espectro de pulverização utilizando cartões hidrossensíveis. A ponta de jato cônico vazio mostrou uma uniformidade de distribuição da calda com a produção de gotas

¹ Eng. Agr., mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, bolsista CAPES/Embrapa, Projeto “*Magnaporthe oryzae*: O desafio da tropicalização do trigo no Brasil.”

muito finas, no entanto não foi tão eficiente quanto às pontas de jatos planos para o controle da doença. As pontas DB 110015 e TJ60 11002, produziram gotas finas e foram similares para os parâmetros avaliados. O uso de volume de calda entre 150 L ha⁻¹ e 200 L ha⁻¹ ofereceu o melhor controle da brusone em trigo.

Palavras-chave: *Pyricularia oryzae*, tecnologia de aplicação, controle químico.

SPRAY SOLUTION DEPOSITION IN ARTIFICIAL COBS BY THREE SPRAY NOZZLES IN FUNGICIDE APPLICATION TO CONTROL WHEAT BLAST

ABSTRACT - The wheat blast is symptomatic in all aerial plant organs, but in the ear there is impairment of productivity. Chemical control is still the main management strategy, but requires studies aimed at better protection of the ear. With this, the objective was to evaluate the spray solution provided by three spray nozzles with three of different spray solution volumes, to control wheat blast. The fungicide was used prothioconazole+trifloxystrobin+Áureo® vegetable oil, and the nozzles and application volumes were hollow cone (JA 1-100 L ha⁻¹); double plane jet (DB 110015-150 L ha⁻¹) and double plane jet (TJ60 11002-200 L ha⁻¹). It was evaluated the severity of the disease on wheat plants inoculated artificially in the laboratory, and the spraying spectrum using water sensitive papercards. The hollow cone nozzle showed a uniformity of the spray distribution producing very fine droplets, however it was not as

efficient as the plane jet nozzles to control the disease. Nozzles DB 110015 and TJ60 11002, produced fine droplets and were considered similar to the parameters evaluated. The use of spray volume of 150 L ha⁻¹ and 200 L ha⁻¹ provides better control of wheat blast.

Key words: *Pycularia oryzae*, application technology, chemical control.

1 INTRODUÇÃO

A brusone do trigo, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, é uma doença limitante para a produção do trigo no Paraguai, na Bolívia, recentemente para a Argentina, e em especial no Brasil Central, quando o espigamento da cultura coincide com chuvas frequentes e temperatura do ambiente próxima a 24 °C (MACIEL et al., 2013). A doença é sintomática em todos os órgãos aéreos da planta, mas é na espiga que há o comprometimento da produtividade, com a formação de grãos deformados, de tamanho reduzido e com baixo peso específico (GOULART et al., 2007). Santana et al. (2013), em experimentos cooperativos à campo no ano de 2011, inferem que em locais com maior ocorrência da brusone do trigo, com a severidade em trone de 95,2%, o rendimento de grãos foi de apenas 165 kg ha⁻¹.

Dentre as estratégias de manejo para a cultura, a alta variabilidade genética do patógeno tem dificultado os programas de melhoramento na obtenção de cultivares resistentes à doença,

sendo assim, o controle químico ainda é a principal alternativa adotada por parte dos produtores (ROCHA et al., 2014). No entanto, a eficiência do controle químico depende: 1) da tecnologia de aplicação que possibilite uma melhor deposição da calda (volume de água, fungicida e adjuvante) sobre o alvo biológico (SCUDELER et al., 2004) com o mínimo de contaminação ambiental; e 2) do potencial de controle do produto químico e da sensibilidade do patógeno à tal produto.

No que compete à tecnologia de aplicação, as perdas nas aplicações ficam entre 30% e 50% (BUISMAN et al., 1989; PERGHER et al., 1997), podendo chegar a casos que ultrapassam os 70% do total aplicado (CHAIM, 2000). Isso, muitas vezes passa despercebido pelo produtor, uma vez que o efeito desejado no controle da doença é atingido, no entanto poderia se obter os mesmos efeitos com menor quantidade de ingrediente ativo (FERNANDES, 1997), se houvesse uma correta aplicação com pontas de pulverização de distribuição homogênea, e espectro de gotas uniforme e de tamanho adequado (CUNHA & SILVA, 2010).

As pontas, um dos componentes dos bicos de pulverização, são as partes mais importantes do circuito hidráulico de um pulverizador, pois regulam a vazão, o tamanho das gotas e a forma do jato emitido (CHRISTOFOLETTI, 1999). A capacidade de penetração das gotas no dossel das culturas depende do tamanho e da energia contida nas mesmas, características que são dadas por cada modelo de ponta, que deve ser escolhido levando em consideração a uniformidade de distribuição da calda e a prevenção de deriva (GULER et al.,

2007). Em geral, gotas finas (diâmetro de 101 a 200 μm) oferecem uma melhor cobertura, pois atingem uma maior quantidade de área num determinado alvo, e gotas grossas (acima de 300 μm) evitam a deriva (MATTHEWS, 1992). Pontas de jato cônico vazio, recomendadas frequentemente nas aplicações em culturas de maior massa foliar, produzem um ângulo de abertura de 60° a 80° e gotas pequenas, que podem favorecer o arraste pelo vento. Já, pontas de jatos planos, geram gotas relativamente maiores e podem ser uma alternativa aos inconvenientes do jato cônico vazio, mas geralmente proporcionam uma pior cobertura do alvo e menor penetração do jato pulverizado no dossel da planta (CUNHA et al., 2004). Uma derivação das pontas de jatos planos são as pontas de jatos planos duplos, que produzem dois jatos tipo leque, com ângulos de abertura variáveis e divergentes entre si, aplicando a calda sobre o alvo por trás e pela frente.

Até pouco tempo, o que se buscava nos tratamentos fitossanitários era o bom molhamento da cultura mediante o emprego de altos volumes de calda, mas pouca atenção era dada à uniformidade e ao tamanho de gotas (FERNANDEZ, 1996). Com as mudanças no setor produtivo, cada vez mais se exige do produtor rural a utilização correta e criteriosa dos recursos e tecnologias disponíveis (SARI et al., 2014), e com isso, a tendência é a redução nos volumes de calda utilizadas visando a maior competitividade agrícola e sustentabilidade ambiental (TEIXEIRA et al., 2010). Baixos volumes de calda têm efeitos diretos na eficiência operacional da aplicação, reduzem o tempo gasto nas atividades de reabastecimento e aumentam o número

de hectares tratados por hora (ANTUNIASSI & BOLLER, 2011). No entanto, a redução do volume de calda requer aprimoramento da tecnologia empregada no campo, para permitir a utilização de pontas e volumes adequados (MENEGHETTI, 2006).

Diversos são os trabalhos em tecnologia de aplicação que tem como alvo as doenças foliares do trigo, no entanto há carência de estudos quanto à proteção da espiga contra a brusone, e com baixos volumes de calda. Assim, objetivou-se neste estudo avaliar a deposição de calda fungicida proporcionada por três pontas de pulverização com três volumes de calda, visando ao controle da brusone do trigo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas instalações da Embrapa Trigo, em Passo Fundo-RS. No Laboratório de Fitopatologia foram feitas repicagens, meios de cultura e preparo de inoculações. Em casa-de-vegetação foram realizados o plantio e a condução da cultura, e em câmara com ambiente controlado, a inoculação. Em ambiente externo, com a influência das condições ambientais, foi realizada a aplicação do fungicida com as três pontas de pulverização.

2.1 Cultivo das plantas

Sementes da cultivar de trigo BRS 220 foram semeadas em 96 vasos com capacidade de 8 L e diâmetro de 22

cm, contendo solo peneirado e corrigido quimicamente. As plantas foram cultivadas de acordo com os tratamentos culturais das indicações técnicas para cultura do trigo (REUNIÃO, 2014), em casa-de-vegetação até o espigamento. Em sequência, procedeu-se com a inoculação de *Magnaporthe oryzae*, aplicação de fungicida e avaliação das espigas sintomáticas e dos cartões hidrossensíveis.

2.2 Isolado de *Magnaporthe oryzae* e inoculação

Foi utilizado o isolado monospórico de trigo, identificado na coleção Embrapa Trigo como Py 12.1.183, de Dourados (MS). Conservado em papel filtro em temperatura de -20 °C, foi retirado e repicado em meio de aveia (60 g de farinha de aveia, 12 g de ágar, 1 L água destilada), e incubado por 15 dias em câmara para crescimento em temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

A obtenção da suspensão de inóculo se deu pela raspagem das placas de Petri contendo as colônias do isolado, com o auxílio de um pincel, água destilada e Tween 80 (1 gota L⁻¹). A contagem dos conídios da suspensão foi realizada em câmara de Neubauer (Loptik Labor 0,0025 mm²) e microscópio óptico (Nikon Eclipse E 200) no aumento de 40x, e a concentração foi ajustada para 100.000 esporos mL⁻¹.

A inoculação se deu entre os estádios de florescimento e início de enchimento de grãos (estádios 63 a 71 da escala de Zadoks et al. (1974)), e foi realizada com atomizador manual, em todas as espigas de trigo, nas 24 h que

antecederam a aplicação do fungicida. Após a inoculação, os baldes com as plantas foram mantidos em câmara com ambiente controlado (Menoncin[®]), no escuro por 24 h, em temperatura de 26 °C, e com nebulização hídrica de 60 s ligada e 1800 s desligada.

2.3 Pontas de pulverização e aplicação do fungicida

Os tratamentos constaram da pulverização do fungicida prothioconazol+trifloxistrobina (produto comercial Fox[®]) 0,4 L ha⁻¹, juntamente com o adjuvante à base de óleo vegetal Áureo[®] (250 mL por 100 L água). Foram comparadas três diferentes pontas de pulverização (Tabela 1) e diferentes volumes de calda, mantendo-se uma testemunha sem aplicação de fungicida.

Tabela 1. Características das pontas de pulverização e parâmetros da pulverização comparados. Passo Fundo-RS, 2016

Ponta	Forma do jato	Pressão (kPa)	Categoria da gota (ASAE)*	Volume de calda (L ha ⁻¹)	Vazão nominal (L min ⁻¹)	Ângulo de abertura
JA 1 (Jacto [®])	Cônico vazio	400	Fina	100	0,32	80°
DB 110015 (Micron [®])	Plano duplo	280	Fina	150	0,56	110° + 30° para frente e 30° para trás
TJ60 11002 (Twinjet [®])	Plano duplo	320	Muito Fina	200	0,79	110° + 30° para frente e 30° para trás

* Segundo informações do fabricante, com base em ASAE - S572, ASAE (2000)

A pulverização da calda se deu em ambiente desprotegido, às 9 h, com um pulverizador costal pressurizado a

gás carbônico (CO₂), e uma barra portando quatro pontas distantes 0,5 m entre si, conduzida a 0,5 m acima das espigas. As condições de temperatura, umidade relativa do ar, velocidade e direção do vento, registradas durante a aplicação foram 21 °C, 60%, 5,0 km h⁻¹ e NE, respectivamente. Realizada sempre pela mesma pessoa, a uma velocidade de deslocamento 4,0 km h⁻¹, a fim de que fosse a mais uniforme possível e por consequência, o volume pulverizado também.

Para cada ponta de pulverização foram utilizadas duas fileiras de 12 vasos distantes 0,20 m entre si, totalizando 24 vasos. Em seguida, as plantas retornaram à câmara de ambiente controlado, permanecendo por 15 dias em fotoperíodo de 12 h com nebulização hídrica de 60 s ligada e 1800 s desligada.

Para captura do espectro de gotas, utilizaram-se cartões hidrossensíveis dispostos em rolos de linha (espigas artificiais) e num suporte de arame colocado ao longo da faixa de pulverização dentro dos vasos com as plantas, na altura das espigas (Figura 1). Os rolos de linha mediram 7,0 cm de comprimento x 2,0 cm de diâmetro e para cada rolo foram utilizados dois cartões hidrossensíveis de tamanho 76 x 26 mm (Syngenta/Micron[®]), totalizando 48 para cada tratamento. Após a passagem do pulverizador, as espigas artificiais foram retiradas do suporte e acondicionadas em papel alumínio para mantê-las fora da exposição de umidade.

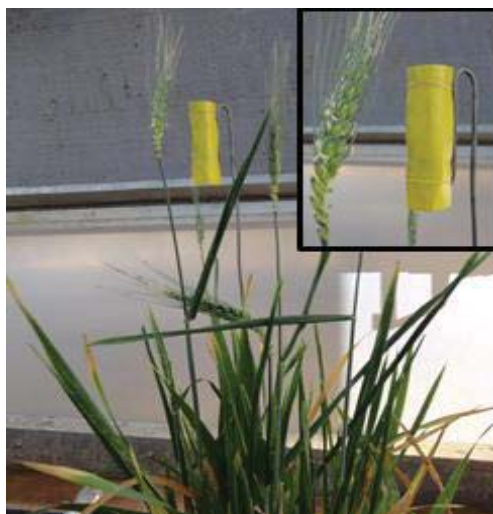


Figura 1. Cartão hidrossensível posicionado de forma a simular a morfologia de uma espiga de trigo. Passo Fundo-RS, 2016

2.4 Avaliação das espigas sintomáticas, do espectro de pulverização e análise dos dados

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados. Para a severidade considerou-se quatro tratamentos (os três tratamentos mais a testemunha sem aplicação de fungicida), dois blocos por tratamento, e 50 espigas por bloco, totalizando 100 espigas avaliadas por tratamento. A avaliação foi realizada 15 dias após a inoculação, utilizando-se a escala diagramática para brusone do trigo elaborada por Maciel et al. (2013). Para a avaliação das características dependentes das pontas e da taxa de aplicação, utilizou-se 48 cartões hidrossensíveis para cada tratamento. As imagens impressas nos cartões foram digitalizadas (resolução de 1200 dpi) e processadas através do programa CIR1.5[®], para leitura e

contagem de impactos em cartões sensíveis. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

a) diâmetro da gota tal que 10% do volume do líquido pulverizado é constituído de gotas de tamanho menor que esse valor ($D_{v0,1}$);

b) diâmetro de gota tal que 50% do volume do líquido pulverizado é constituído de gotas de tamanho menor que esse valor, também conhecido por diâmetro mediano volumétrico ($D_{v0,5}$ ou DMV),

c) diâmetro de gota tal que 90% do volume do líquido pulverizado é constituído de gotas de tamanho menor que esse valor ($D_{v0,9}$);

d) a porcentagem de cobertura (COB);

e) a porcentagem de recuperação (REC);

f) o coeficiente de homogeneidade (CH);

g) a porcentagem do volume de gotas com diâmetro inferior a 100 ($\varnothing < 100$) e 200 μm ($\varnothing < 200$);

h) a densidade de gotas (DG)

i) a amplitude relativa (SPAN) dada pela equação:

$$\text{SPAN} = (D_{v0,9} - D_{v0,1}) / (\text{DMV}).$$

Os dados foram submetidos à análise da variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa estatístico ASSISTAT 7.7 beta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da deposição do fungicida com as diferentes pontas e seus respectivos volumes de calda, mostraram diferenças significativas nas variáveis do espectro da pulverização nas espigas artificiais estudadas e no controle da brusone na espiga do trigo.

Para a distribuição volumétrica das gotas por classes de tamanho (Figura 2), pôde-se observar que a ponta de jato cônico (JA 1) com um volume de calda 100 L ha^{-1} foi a que apresentou as menores médias para $D_{v0,5}$ ($128,25 \mu\text{m}$), $D_{v0,1}$ ($85,87 \mu\text{m}$), e $D_{v0,9}$ ($182,75 \mu\text{m}$). Ambas as pontas de jato plano duplo não diferiram estatisticamente entre si para $D_{v0,5}$ e $D_{v0,1}$. No entanto, a ponta DB 110015 com um volume de aplicação de 150 L ha^{-1} , mostrou-se superior às demais com relação ao $D_{v0,9}$ ($298,17 \mu\text{m}$), sendo assim, foi a ponta que produziu gotas de maior diâmetro. A classificação do tamanho de gotas de uma ponta, é feita comparativamente por padrões já estabelecidos pela Associação Americana de Engenheiros Agrícolas (ASAE) em relação ao $D_{v0,5}$, ou também conhecido como DMV. Com o obtido, a ponta JA 1 com uma média de $128,25 \mu\text{m}$ em uma pressão de trabalho de 400 kPa , produziu gotas muito finas, e não finas, como é classificada. A ponta DB 110015 em uma pressão de trabalho de 280 kPa , produziu gotas com diâmetro de $167,84 \mu\text{m}$, classificada como gota fina, estando de acordo com ASAE. E a ponta TJ 60 11002 em uma pressão de trabalho de 320 kPa , produziu gotas de $160,01 \mu\text{m}$, pôde ser classificada como fina, e não como muito fina, como pela ASAE. A

possibilidade de interferência da pressão no tamanho de gotas encontrada é possível, no entanto foram utilizadas pressões de acordo com as recomendações dos fabricantes levando em consideração o volume pulverizado.

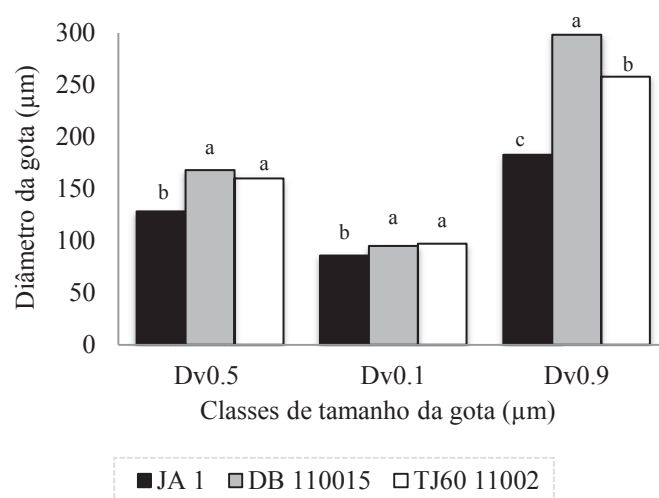


Figura 2. Distribuição volumétrica das gotas por classes de tamanho, por diferentes pontas. Passo Fundo – RS, 2016

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CV (%) para $D_{v0,5}$, $D_{v0,1}$, $D_{v0,9}$, respectivamente, são: 17,34; 11,42; e 25,36.

A interpretação dos valores de porcentagem do volume de gotas com diâmetro inferior a 100 e 200 µm permite estimar o potencial de deriva da aplicação. Quanto menor essa porcentagem menor o risco de deriva do agrotóxico durante uma aplicação (CUNHA et al., 2004). Para tanto, as médias das porcentagens de diâmetro de gota < 100 µm e < 200 µm foram, respectivamente: para a ponta JA 1, de 21,73% e 94,95%; para DB 110015, de 13,16% e 70,24%; e para TJ60 11002, de 11,92% e 75,42% (Figura 3). Novamente pôde-se perceber a

diferença entre os tipos de jato pulverizados, em que o jato cônico vazio produziu uma maior porcentagem de gotas com diâmetro menor que 100 μm , com maior potencial de sofrer ação de fatores externos como deriva e evaporação. Ambas as pontas com jatos planos duplos foram muito similares para o caráter estudado, com porcentagens de diâmetro inferior a 100 μm menores que 15%, portanto, seguras para uma aplicação terrestre, conforme Cunha et al. (2003).

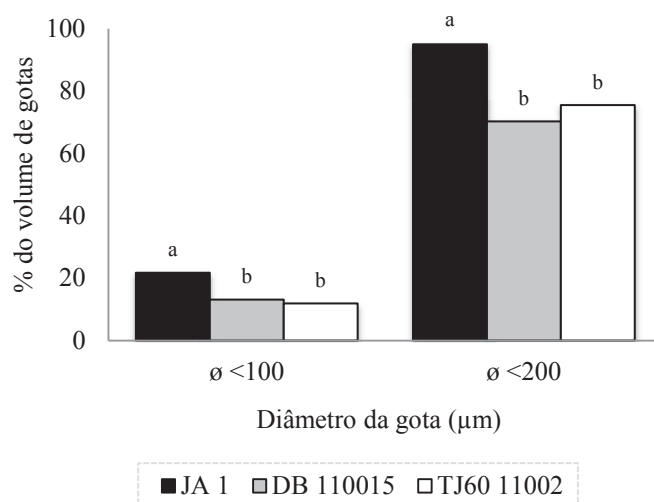


Figura 3. Gotas com diâmetro inferior a 100 e 200 μm pulverizada por diferentes pontas. Passo Fundo – RS, 2016

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CV(%) para diâmetro < 100 e < 200 , respectivamente, são: 53,36; e 14,89.

Algumas relações existentes a partir da análise do espectro de pulverização são imprescindíveis na escolha da melhor ponta. Em geral, quanto menor o diâmetro mediano volumétrico das gotas (DMV), maior será a densidade de gotas (DG) e também maior a cobertura (COB) do alvo pulverizado

(CUNHA & SILVA, 2010). No entanto, o que se observou no espectro gerado pela ponta JA 1 foi um menor DMV, menor DG e menor COB (Figura 4). Isso pode ter sido em decorrência da ponta ter gerado gotas muito finas, que dificultaram a deposição e captura no papel hidrossensível e também, sofreram deriva.

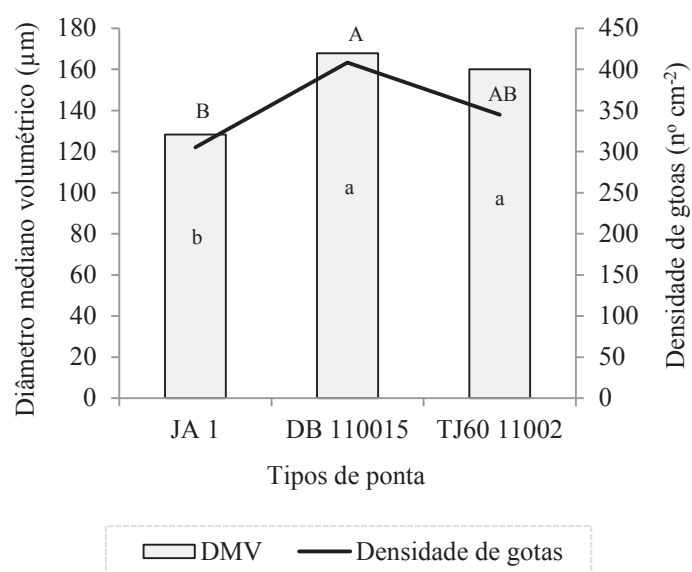


Figura 4. Diâmetro mediano volumétrico versus número de impactos cm^{-2} , por diferentes pontas de pulverização. Passo Fundo – RS, 2016

Médias seguidas de mesma letra na coluna e na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CV (%) para DMV e DG, respectivamente, são: 17,34; e 52,72.

A ponta de jato plano duplo DB 110015 apresentou o maior número de gotas impactadas sobre o alvo quando comparada a ponta de jato cônico vazio JA 1, e as médias da DG para ambas as pontas foram, respectivamente: 408,1 gotas cm^{-2} e 305 gotas cm^{-2} . A ponta TJ60 11002, ficou numa posição

intermediária, com DG média de 344,7 gotas cm^{-2} , não diferindo das outras pontas estudadas. Stefanelo et al. (2014), embora sem evidências de diferença estatística entre pontas hidráulicas, observou uma maior DG em pontas do tipo cone vazio em comparação à ponta do tipo leque. Quando se compara a outros trabalhos de deposição de fungicida, a maioria para doenças foliares, o que se observou foi que os valores de densidade de gota foram altos. No entanto, considerando a posição destacada do alvo (espigas artificiais) sobre o dossel de plantas, maior será o número de impactos sobre o mesmo. E quanto à relação direta da DG com a cobertura, era esperado, uma vez que um maior número de impactos oferece uma maior deposição de calda, e isto refletiu em menor severidade da doença (Figura 5).

Boller et al. (2007), inferem que a densidade de gotas é fator limitante à medida que se diminui o volume de aplicação, e menos impactante em altos volumes. A cobertura dada pelas gotas da pulverização e a severidade de uma doença estão intimamente ligadas, em especial para alvos como a espiga, onde não há translocação do fungicida, e a ação fungitóxica vai acontecer pelo contato do patógeno com o produto. A escolha certa da ponta dependerá da cobertura satisfatória em muitas situações (ROMÁN et al., 2009). Para tanto, as pontas de jato plano DB 110015 e TJ60 11002 apresentaram uma cobertura de aproximadamente 2 vezes superior à ponta de jato cônico JA 1. As médias da porcentagem da cobertura dos alvos artificiais para essas pontas, foram de, respectivamente: 30,06%, 26,34% e 17,3% (Figura 5). Estudos inferem que devido a características como presença de gotas

finas e ângulo de ataque duplo, para frente e para trás, as pontas jato plano duplo, incrementam a cobertura em 40 % (ROMÁN et al., 2009). Para Schröder (1996), as gotas finas se depositam melhor, e mais facilmente nos alvos ou superfícies de deposição verticais.

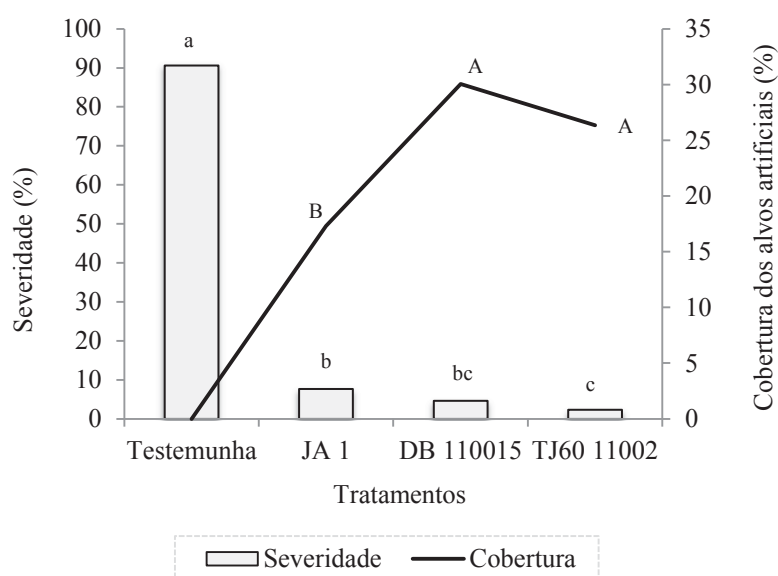


Figura 5. Perfis de cobertura pelas diferentes pontas versus a severidade da doença. Passo Fundo – RS, 2016

Médias seguidas de mesma letra na coluna e na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CV (%) para SEV e COB, respectivamente, são: 34,59; e 45,35.

As três pontas com seus respectivos volumes de calda pulverizados diferiram da testemunha para a severidade da brusone na espiga (Figura 5). As médias de severidade foram: para a testemunha (90,6%), para as plantas com pulverização de fungicida com a ponta JA 1 + 100 L ha⁻¹ (7,65%), com a ponta DB 110015 + 150 L ha⁻¹ (4,67%), e com a ponta TJ60 11002 + 200 L ha⁻¹ (2,33%). Para a maioria dos parâmetros estudados, as

duas pontas de jato plano apresentaram similaridade de respostas, no entanto apesar de não haver diferenças estatísticas, ao observar severidade da doença, a ponta jato plano duplo utilizada com maior volume de calda (TJ60 11002 + 200 L ha⁻¹) se destacou. Com isso, foi possível observar que o aumento do volume de calda aplicado e a deposição pela frente e por trás da espiga, pode ter sido fundamental para o controle da patologia na espiga, alvo tão minucioso para se chegar com o fungicida. Conforme Meneghetti (2006), as pontas do tipo jato plano, apresentam um DMV maior, o tempo de extinção da gota é maior, e a severidade da doença é menor, quando comparado à pontas de jatos cone.

Entretanto, intriga o fato da ponta TJ60 11002, ter apresentado uma menor severidade com menor porcentagem de cobertura do alvo, quando comparado a ponta DB 110015 (Figura 5). E isso pode ser justificável por dois motivos. Primeiramente pelo fato do DMV da ponta DB 110015 ter sido superior, fazendo com que a gota ficasse mais pesada e ao impactar sobre o alvo (papel hidrossensível) na vertical pode ocorrer escorrimento, e assim o programa computacional faz leituras superestimando a porcentagem da cobertura. Em segundo, pelos altos valores do coeficiente de variação da cobertura obtidos. Sari et al. (2014), Stefanelo et al. (2014), Cunha et al. (2007), relataram algumas limitações do uso de papéis hidrossensíveis para avaliação da pulverização.

Trabalhos em tecnologia de aplicação divergem sobre questões como tipos de ponta versus volume de aplicação. Santos et al. (2005), não encontraram interação significativa

entre pontas de pulverização e volume de calda. Já, Viana (2006) obteve incremento da cobertura com aumento da taxa de aplicação. E, Román et al. (2009), observaram acréscimo na porcentagem de cobertura com acréscimo do volume aplicado com pontas de jato cônico. O uso de menor volume de calda aumentaria a autonomia operacional, e permitiria que a pulverização fosse realizada durante o período com as melhores condições climáticas (SARI et al., 2014), mas deve ser usado com cautela uma vez que as culturas divergem entre si, em especial no que se trata de arquitetura de planta e alvo pretendido. Ainda, aumentar o volume de calda para pontas que produzam gotas muito finas, como as de jato cônico, maior será a suscetibilidade aos efeitos de deriva, e riscos ao ambiente e ao aplicador.

Quanto ao volume de calda recuperado pelos alvos artificiais (Figura 6), pôde-se ter uma perspectiva do quão difícil é atingir um alvo na vertical e que está sobressalente à cultura, pois o máximo recuperado foi de 54,04% e com a ponta DB 110015. A ponta TJ60 11002 apresentou uma recuperação de calda de 34,56%, e a ponta JA1, de 39,2%. Ambas não difeririam estatisticamente entre si.

A qualidade da pulverização e o desempenho das pontas podem ser quantificados pela amplitude de distribuição volumétrica (SPAN) e pelo coeficiente de homogeneidade (CH). A SPAN fornece a dispersão dos dados em torno do valor do DMV (CHRISTOFOLLETI, 1999). Sendo assim, quanto mais próximo de zero for a SPAN, menos dispersos foram os dados e mais uniforme foi a amplitude de tamanho das gotas

pulverizadas. Já para o CH, por ser a razão entre diâmetro mediano volumétrico e diâmetro mediano numérico, quanto mais próximo de 1, mais homogêneo é o desempenho da ponta.

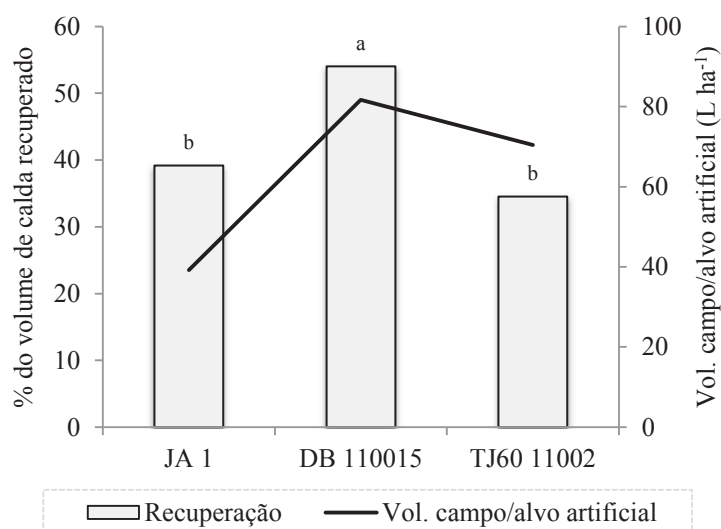


Figura 6. Recuperação da calda pulverizada por três pontas de pulverização. Passo Fundo – RS, 2016

Médias seguidas de mesma letra na coluna e na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CV (%) para REC: 53,82.

Contudo, a ponta de jato cônico foi a que apresentou os menores valores para os parâmetros acima citados (Figura 7), sugerindo o melhor desempenho dentre as pontas estudadas. Isso significa que todo potencial de trabalho da ponta foi explorado, no entanto não foi o suficiente quando comparamos às pontas de jato plano para outras características, como mostrou a deposição nos cartões hidrossensíveis (Figura 8).

Ainda, pode-se dizer que, a uniformidade de distribuição da calda é dada por: condições de montagem da barra, espaçamento entre os bicos, altura da barra, pressão de

trabalho, dentre outros (CUNHA & SILVA, 2010), o que justificaria uma menor uniformidade das pontas jato plano seria então, um ajuste dessas condições operacionais. Para pontas de jato plano as pressões ótimas seriam próximas a 300 kPa e a altura da barra de 0,5 m, no entanto não se pode generalizar uma condição ideal para todas as pontas (RODRIGUES et al., 2004). De maneira geral no Brasil, se utiliza o espaçamento entre os bicos de 0,5 m, mas a altura da barra é variável e deve ser estudada, de forma a combinar essas duas variáveis a fim de se obter a melhor uniformidade de distribuição (CUNHA & RUAS, 2006).

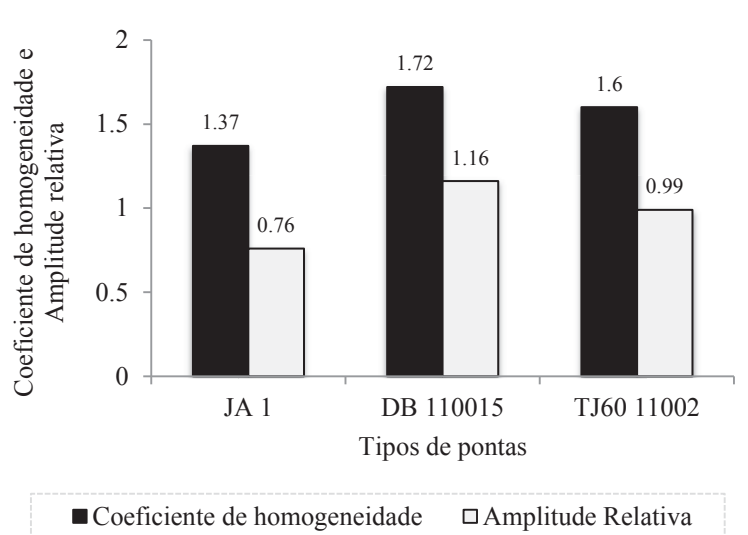


Figura 7. Homogeneidade e uniformidade do espectro de gotas pulverizadas por diferentes pontas. Passo Fundo – RS, 2016

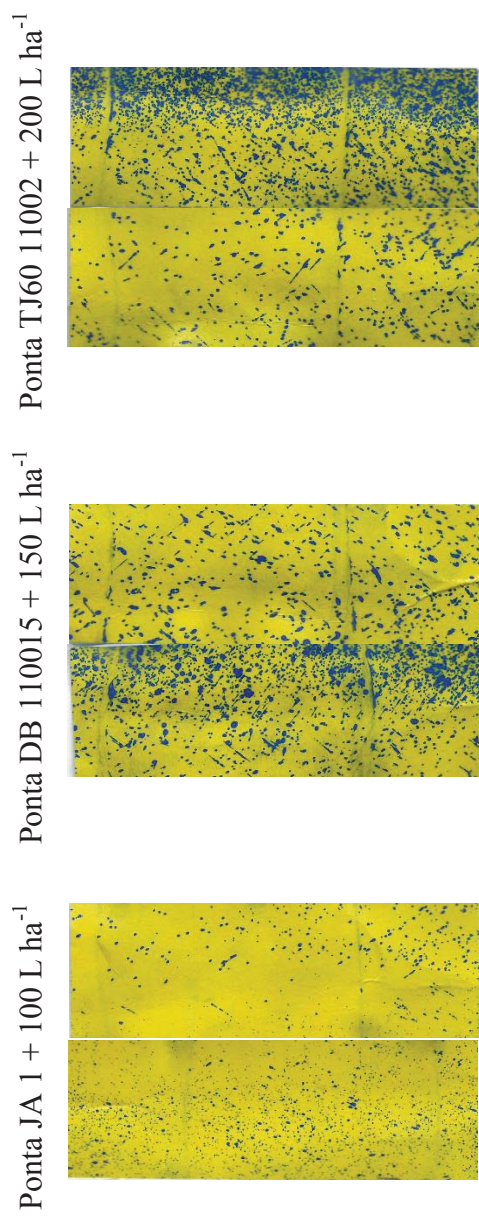


Figura 8. Deposição do fungicida obtida em cartões hidrossensíveis posicionados verticalmente no dossel da cultura do trigo, por diferentes pontas de pulverização e diferentes volumes de aplicação. Passo Fundo – RS, 2016

4 CONCLUSÕES

- a) A ponta de jato tipo cone vazio, JA1, apesar de apresentar uniformidade de distribuição da calda, produz tamanhos de gota muito finas, facilmente sujeitas à deriva e à evaporação.
- b) As pontas de jatos planos, que produzem uma pulverização de categoria de gotas finas, apresentam amplo potencial para o controle da brusone em trigo, no entanto necessitam de ajustes quanto a distância das pontas na barra e altura de aplicação.
- c) Reduzir o volume de calda aplicada visando proteger a espiga do trigo compromete negativamente o controle da doença e pode se tornar um agente seletivo para a resistência de fitopatógenos.

REFERÊNCIAS

ABITRIGO – Estatísticas Trigo. Associação Brasileira da Indústria do Trigo. *Suprimento e uso de trigo em grão no Brasil, produção e consumo de trigo USDA, e países autorizados a exportar trigo ao Brasil*. (2016) Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/>. Acesso em: 24 de fev. 2016.

ADREIT, H.; SANTOS, O.; ANDRIANTSIMIALONA, D.; UTAMI, D. W.; NOTTÉGHEM, J. L.; LEBRUN, M. H.; THARREAU, D. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology. Notes*, v. 7, n. 4. p. 667-670, 2007.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 4ed. New York: Wiley & Sons, 1996. 869p.

ALMEIDA, G.M. *Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de Moniliophthora perniciosa (fungo da vassoura de bruxa) em Saccharomyces cerevisiae*. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ANESIADIS, T.; KAROAGLANIDIS, G. S.; TZAVELLAKLONARI, K. Protective, curative and eradicator activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.11-12, n. 151, p. 647-651, 2003.

ANTUNIASSI, U. R. *Tecnologia de aplicação de defensivos*. Botucatu: FCA/UNESP. 2006. 60p.

ANTUNIASSI, U. R.; BOLLER, W. Tecnologia de aplicação de fungicidas. In: ANTUNIASSI, U. R.; BOLLER, W. *Tecnologia de aplicação para culturas anuais*. Passo Fundo: Ed. Aldeia Norte, 2011. p. 221-229.

ARAKI, Y.; SUGIHARA, M.; SAWADA, H.; FUJIMOTO, H.; MASUKO, M. Monitoring of the sensitivity of *Magnaporthe grisea* to metominostrobin 2001-2003: no emergence of resistant strains and no mutations at codon 143 or 129 of the cytochrome b gene. *Journal of Pesticide Science*, Tokyo, v. 30, n. 3, p. 203-208, 2005.

ARRUDA, M. A.; BUENO, C. R. N.; ZAMPROGNO, K. C.; LAVORENTI, N. A.; URASHIMA, A. S. Reação do trigo à *Magnaporthe grisea* nos diferentes estágios de desenvolvimento. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 30, n. 2, p. 121-126, 2005.

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

AVOZANI, A.; TONIN, R. B.; REIS, E. M.; CAMERA, J.; RANZI, C. In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum* isolates to fungicides. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 40, n. 3, p. 231-247, 2014.

AZEVEDO, J. L. *Genética de microrganismos*. 2ed. Goiânia: Editora UFG, 2008. 536 p.

BALAN, M. G.; SAAB-ABI, O. J. G.; SILVA, C. G.; RIO, A. Deposição da calda pulverizada por três pontas de pulverização sob diferentes condições meteorológicas. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n. 2, p. 293-298, 2008.

BARKSDALE, T.; ASAI, G. N. Diurnal spore release of *Piricularia oryzae* from rice leaves. *Phytopathology*, St. Paul, v. 51, n. 1, p. 313-317, 1961.

BECHER, R.; HETTWER, U.; KARLOVSKY, P.; DEISING, H.B.; WIRSEL, S.G.R.; Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology*. St. Paul, v. 100, n. 5, p. 444-453, 2010.

BEYER, M.; KIESNER, F.; VERREET, J.A.; KLINK, H. Fungicide sensitivity of *Septoria tritici* field isolates is affected by an interaction between fungicidal mode of action and time. *Journal of Plant Pathology*. Bari , v. 93, p. 1.7-1.13, 2011. Supplement.

BOLLER, W. B; FORCELINI, C. A; HOFFMANN, L. L. Tecnologia de aplicação de fungicidas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 15, s/n, p. 243-276, 2007.

BONATO, A. L. V; MUNIZ, J. B; MACIEL, J. L. N; ORTIZ, J. C. *Otimização do método de extração de DNA de Magnaporthe oryzae de trigo* (2014). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital>>. Acesso em: 27 out. 2015.

BRONDANI, R. P.; BRONDANI, R. P. V. GARRIDO, L. C.; FERREIRA, M. E. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 753-762, 2000.

BRUNO, A. C.; URASHIMA, A. S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do Trigo e de Outros Hospedeiros. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 1, p. 21-26, 2001.

BUISMAN, P.; SUNDARAM, K. M. S.; SUNDARAM, A.; TRAMMEL, K. Field deposit patterns of a diflubenzuron spray mix, after application to apple orchard using an airblast, and a laboratory evaluation of physical properties and atomization characteristics. *Journal of Environmental Science and Health*, New York, v. 24, n. 4, p. 389-411, 1989.

CABRERA, M. G.; GUTIÉRREZ, S. A. Primer registro de *Pyricularia grisea* en cultivos de trigo del noreste de Argentina. In: JORNADA DE ACTUALIZACIÓN EN ENFERMEDADES DE TRIGO. 1., *Resúmenes...* Buenos Aires: Lavallol, 2007. 1 CD-ROM.

CASTROAGUDÍN, V. L.; CERESINI, P. C.; DE 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 *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 105, n. 3, p. 284-294, 2015.

CERESINI, P. C. ; MACIEL, J. L. N. ; KONH, L. ; LEVY, M. ; MCDONALD, B. A. Origin for the wheat-adapted populations of *Magnaporthe oryzae* in Southern Brazil and levels of gene flow 20 years after the first epidemics. In: IPPC INTERNATIONAL PLANT PROTECTION JOINT MEETING, 101., 2011, Honolulu - USA. *Annals of the IPPC International Plant Protection Joint Meeting, 2011*. St Paul: American Phytopathological Society, 2011. s221.

CHADHA, S.; SHARMA, M. Transposable elements as stress adaptive capacitors induce genomic instability in fungal pathogen *Pyricularia oryzae*. *Plos One*, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-14, 2014.

CHAIM, A. *Manual de tecnologia de aplicação de agrotóxicos*. Distrito Federal: Embrapa Informação Tecnológica Editora, 2009. 73 p.

CHAIM, A.; VALARINI, P. J.; PIO, L. C. Avaliação de perdas na pulverização de agrotóxicos na cultura do feijão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 10, s/n., p.13-22, 2000.

CHEN, D. H.; ZEIGLER, R. S.; LEUNG, H.; NELSON, R. J. Population structure of *Pyricularia oryzae* at two screening sites in the Philippines. *Phytopathology*, St. Paul, v. 85, n. 9, p. 1011-1020, 1995.

CHEN, Y.; YAO, J.; WANG, W-X.; GAO, T-C; YANG, X.; ZHANG, A-F. Effect of epoxiconazole on rice blast and rice grain yield in China. *European Journal Plant Pathology*, Netherlands, v. 135, n. 3, p. 675-682, 2013.

CHRISTOFOLETTI, J. C. Considerações sobre a deriva nas pulverizações agrícolas e seu controle. São Paulo: *Teejet South America*, 1999. 15p.

CONSOLO, V. F.; CORDO, C. A.; SALERNO, G. L. Mating-type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from Argentina. *Mycopathologia*, Berkeley, v. 160, p. 285-290, 2005.

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

COUCH, B.C.; FUDAL, I.; LEBRUN, M. H.; THARREAU, D.; VALENT, B.; VAN KIM, P.; NOTTÉGHEM, J.; KOHN, L.M. Origins of Host-Specific Populations of the Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in Crop Domestication with Subsequent Expansion of Pandemic Clones on Rice and Weeds of rice. *Genetics*, Bethesda, v.170, s/n, p.613-630, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento de safra brasileira de grãos 2014/2015*. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acessado em: 21 jan. 2016.

CREGAN, P. B.; BHAGWAT, A. A.; AKKAYA, M. S.; JIANG, R. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, v. 5, s/n, p. 49-61, 1994.

CRUZ, C. D. *Programa Genes*: Biometria. Editora UFV: Viçosa, 2006. 382 p

CRUZ, M. F. A.; DINIZ, A. P. C.; RODRIGUES, F. A.; BARROS, E. G. de. Aplicação foliar de produtos na redução da severidade da brusone do trigo. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 36, n. 6, p. 424-428, 2011.

CRUZ, M. F. A.; 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. 024-031, 2010.

CUNHA, J. P. A. R.; RUAS, R. A. A. Uniformidade de distribuição volumétrica de pontas de pulverização de jato plano com indução de ar. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 61-66, 2006.

CUNHA, J. P. A. R.; TEIXEIRA, M. M. Características técnicas de bicos de pulverização hidráulicos de jato plano. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*, Campina Grande, v. 5, n. 2, p. 344-348, 2001.

CUNHA, J. P. A. R.; TEIXEIRA, M. M.; COURY, J. R.; FERREIRA, L. R. Avaliação de estratégias para redução da deriva de agrotóxicos em pulverizações hidráulicas. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2003.

CUNHA, J. P. A. R.; TEIXEIRA, M. M.; FERNANDES, H. C. Avaliação do espectro de gotas de pontas de pulverização hidráulicas utilizando a técnica de difração do raio laser. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 10-15, 2007.

CUNHA, J. P. A. R.; TEIXEIRA, M. M.; VIEIRA, R. F.; FERNANDES, H. C.; COURY, J. R. Espectro de gotas de bicos de pulverização hidráulicos de jato plano e de jato cônico vazio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n. 10, p. 977-985, 2004.

CUNHA, J. P. A.; SILVA, R. A. M. Uniformidade de distribuição volumétrica de pontas de pulverização em função da pressão de trabalho e altura da barra. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 52-58, 2010.

DANELLI, A. L. D. *Pyricularia oryzae: virulência de isolados, densidade de conídios no ar e efeito do nitrogênio na suscetibilidade do trigo*. 2015. 177 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PAVAN, W.; PIEROBOM, C. R. Simulação da dinâmica do florescimento do trigo como base para um modelo de risco de giberela. *Revista Brasileira Agrobiologia*, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 323-331, 2004.

DEKKER, H. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: LYR, H. (Ed.). *Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action*. 2ed. New York: Gustav Fisher, 1995, p. 23-38.

DOBINSON, K. F.; HARRIS, R. E.; HAMER, J. E. Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interact*, St. Paul, v. 6, n. 1, p. 115-126, 1993.

DUVEILLER, E.; HODSON, D.; TIEDEMANN AV. Wheat blast caused by *Magnaporthe grisea*: a reality and new challenge for wheat research. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 8., 2010. *Abstracts...* Russia: St. Petersburg, 2010. p. 247-248.

EBBOLE, D. J. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, St. Paul, v. 45, p. 437-456, 2007. Supplement.

EDGINGTON, L. V.; KLEW, K. L.; BARROW, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, St. Paul, n. 61, p. 42- 44, 1971.

ESPINOZA, I. G.; SHOHARA, K. *Investigación relativa a la ocurrencia de Piricularia en trigo*. Santa Cruz: Centro Tecnológico Agropecuario en Bolivia, 2003. (Boletim Técnico, 2).

FALEIRO, F. G. *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p

FARMAN, M. L.; TOSA, Y.; NITTA, N.; LEONG, S. A. MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular and General Genetics*, v. 251, p. 665-674, 1996.

FERNANDES, H.C. Aplicação de defensivos agrícolas: teoria da gota. *Revista Engenharia na Agricultura - Série Caderno Didático*. Viçosa, n. 24, p. 1-14, 1997.

FERNANDEZ, J. M. C. *Maquinaria para tratamentos fitossanitários*. Madrid: Mundi-Prensa Libros Editora, 1996. 160 p.

FERNANDEZ, M. R. *Manual para laboratório de fitopatologia*. 1ed. Passo Fundo: Embrapa, 1993.128 p.

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 1, p. 27-35, 2001.

FRAC (FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE). In: List of pathogens with field resistance towards IQo fungicides. Disponível em: <<http://www.frac.info>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

GALBIERI, R.; URASHIMA, A. S. Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual entre isolados de *Pyricularia grisea* de diferentes hospedeiros. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 22-28, 2008.

GASSEN, D. Aplicação sem erros. *Cultivar Grandes Culturas*, Pelotas, v. 5, n. 48, p. 30-31, 2003.

GARRIDO, L. R. *Desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipervariáveis do genoma de Magnaporthe grisea na análise da estrutura de populações do patógeno infectando plantações de arroz*. 2001. 90 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

GHINI, R.; KIMATI, H. *Resistência de fungos a fungicidas*. 1ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; SHIU, P. K. T. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Reviews Genetics*, v. 34, p. 165-186, 2000.

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

GOULART, A. C. A. Perdas em trigo causadas pela brusone. In WOKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., 2004, VIÇOSA. *Anais...* Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p. 123-130.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A.; MESQUITA, A. N. Ocorrência de brusone do trigo (*Pyricularia oryzae* Cav.) no Estado do Mato Grosso do Sul. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 9-16, 1989.

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

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

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

GULER, H.; ZHU, H. E.; KERKSEN, R. C.; YU, Y.; KRAUSE, C. R. Spray characteristics and drift reduction potential with air induction and conventional fan-fan nozzles. *Transaction of the ASAES*, St. Joseph, v. 50, n. 3, p.745-754, 2007.

HAMER, J. E. Molecular probes for rice blast disease. *Science*, Washington, v. 252, p. 632-633, 1991.

HAYASHI, N.; LI, Y.C.; NAITO, H. *In vitro* production on rice plants of perithecia of *Magnaporthe grisea* from Yunnan, China. *Mycological Research*, Cambridge, v. 101, n. 11, p. 1308-1310, 1997.

HEBERT, T. T. Production of the perfect stage of *Pyricularia* from rice and other hosts. In: HORIZONTAL RESISTANCE TO THE BLAST DISEASE OF RICE. 1971. *Proceedings of a seminar held at Centro Inter-nacional de Agricultura Tropical*, Cali, Colombia, p. 161-164, 1975.

HEBERT, T. T. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 61, n. 1, p. 83-87, 1971.

HOWARD, R. J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, St. Paul, v. 50, n. 1, p. 491-512, 1996.

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

IGARASHI, S.; UTIAMADA, C. M.; IGARASHI, L. C.; KAZUMA, A. H; LOPES, R. S. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 2, p. 351-352, 1986.

ITOI, S; MISHIMA, T; ARASE, S. NOZU, M. Mating Behavior of Japanese Isolates of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 73, p. 155-158, 1983.

JESUS JUNIOR, W. C.; POZZA, E. A.; VALE, F. X. R.; AGUILERA, G. M. Análise temporal de epidemias. In: VALE, F.X.R., JESUS JUNIOR, W.C.; ZAMBOLIM, L. Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. Belo Horizonte: Ed. Perfil, p. 203-273, 2004.

KANG, S.; LEBRUN, M. H.; FARRALL, L.; VALENT, B. Gain of virulence caused by insertion of a *Pot3* transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, St. Paul, v. 14, n. 5, p. 671-674, 2001.

KATO, H.; YAMAGUCHI, T. The perfect stage of *Pyricularia oryzae* Cav. in culture. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, Tokyo, v. 98, n. 2, p. 607-612, 1982.

KATO, H.; YAMAGUCHI, T.; NISHIHARA, N. The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. in culture. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, Tokyo, v. 42, n. 4, p. 507-510, 1976.

KAYE, C.; MILAZZO, J.; ROZENFELDB, S.; LEBRUN, M. H.; THARREAU, D. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genetics and Biology*, Madison, v. 40, n. 3, p. 207-215, 2003.

KENDALL, S.; HOLLOMON, D.W.; ISHII, H.; HEANEY, S.P. Characterization of benzimidazole-resistant strains of *Rhynchosporium secalis*. *Pesticide Science*, New York, n. 3, v. 40, p. 175-181, 1994.

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.

KIM, Y. S.; OH, Y. J.; HWANG, B. K.; KIM, K. D. Variation in sensitivity of *Magnaporthe oryzae* isolates from Korea to edifenphos and iprobenfos. *Crop Protection*. Guildford, v. 27, n. 11, p. 1464-1470, 2008.

KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review Phytopathology*, St. Paul, v. 30, n. 1, p. 131-152, 1992.

KNEZEVIC, S. Z.; STREIBIG, J. C.; RITZ, C. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology*, v. 21, n. 3, p. 840-848, 2007.

KOHLI, M. M.; MEHTA, Y. R.; GUZMAN, E.; DE VIEDMA, L.; CUBILLA, L. E. *Pyricularia* blast- a threat to wheat cultivation. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, Slezská, v. 47, p.130–134, 2011.

KOHLI, M. M.; MEHTA, Y. R.; GUZMAN, E.; VIEDMA, L.; CUBILLA, L. E. *Pyricularia* blast – a threat to wheat cultivation. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 8., 2010. *Abstracts...* Russia: St. Petersburg, 2010. p. 273.

KRANZ, J.; ROYLE, D. J. Perspective in mathematical modeling of plant disease epidemics. In: SCOTT, P.R. & BAINBRIDGE, A. (Eds). *Plant Disease Epidemiology Blackwell Scientific Publications*, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1978, p. 111-120.

KUMAR, J.; NELSON, R. J.; ZEIGLER, R. S. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics*, Pittsburg, v. 152, n. 3, p. 971-984, 1999.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review Phytopathology*. St. Paul, v. 31, n. 1, p. 2336-2342, 1993.

LEUNG, H.; BORRAMEO, E. S.; BERNARDO, M. A.; NOTTEGHEM, J. L. Genetic analysis of virulence in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 1227-1233, 1988.

LI, Y.; QUE, Y.; LIU, Y.; YUE, X.; MENG, X.; ZHANG, Z.; WANG, Z. The putative Gy subunit gene MGG1 is required for conidiation, appressorium formation, mating and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetic*, Berlin, v. 61, p. 641-651, 2015.

MA, B.; UDDIN, W. Fitness and competitive ability of an azoxystrobin-resistant G143A mutant of *Magnaporthe oryzae* from perennial ryegrass. *Plant Disease*, St. Paul, v. 93, n. 10, p. 1044-1049, 2009.

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

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

MACIEL, J. L. N.; CERESINI, P. C.; CASTROAGUDIN, V. L.; ZALA, M.; KEMA, G. H. J.; McDONALD, B. 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.

MACIEL, J. L. N.; DANELLI, A. L. D.; BOARETTO, C.; FORCELINI, C. A. Virulência de isolados de *Magnaporthe oryzae* do trigo e de Poáceas invasoras. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 7., 2013, Londrina. *Anais...* Londrina: Fundação Meridional/Iapar, 2013. p.15

MACIEL, J. L. N.; PALUDO, E. A.; SILVA, M. S. P. L. S.; CAIERÃO, E. *Reação à brusone de genótipos de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo no estágio de planta adulta*. 2008. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

MACIEL, J. L. N.; DANELLI, A. L. D.; BOARETTO, C.; FORCELINI, C. A. Diagramatic scale for the assessment of blast on wheat spikes. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 39, n. 3, p. 162-166, 2013.

MAGAR, P. B.; ACHARYA, B.; PANDEY, B. Use of chemical fungicides for the management of rice blast (*Pyricularia grisea*) disease at Jyotinagar, Chitwan, Nepal. *International Journal of Applied Science and Biotechnology*, Birganj, v. 3, n. 3, p. 474-478, 2015.

MARCEL, S.; SAWERS, R.; OAKELEY, E.; ANGLIKER, H.; PASZKOWSKI, U. Tissue-adapted invasion strategies of blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*, Rockville, v. 22, n. 9, p. 3177-3187. 2010.

MAROCHI, A. I. Tecnologia de aplicação de herbicidas dessecantes e pós-emergentes no sistema plantio direto. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DO SISTEMA PLANTIO DIRETO, 1., 1995, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1995. p. 134-135.

MAROCHI, A. I.; SCHMIDT, W. *Plantio direto na palha: tecnologia de aplicação de Scorpion no sistema*. Castro: Fundação ABC; Dow Elanco, 1996. 43 p.

MÁRQUEZ, L. D. *Tecnología para la aplicación de productos fitosanitarios*. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, 1997. 28 p.

MASSOLA Jr, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; KIMATI,.; REZENDE, J. A.; CAMARGO, L. E. A. (Orgs). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011, p. 149-206.

MATTHEWS, G. A. *Pesticide Application Methods*. 3 ed. London: Blackwell Science, 1992. 448 p.

MATUO, T. *Técnicas de aplicação de defensivos agrícolas*. Jaboticabal: FUNEP, 1990. 139 p.

MEKWATANAKARN, P.; KOSITRATANA, W.; PHROMRAKSA, T.; ZEIGLER, R. S. Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. *Plant Disease*, St. Paul, v. 83, n. 10, p. 939-943, 1999.

MENEGHETTI, R. C. *Tecnologia de aplicação de fungicidas na cultura do trigo*. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Pós Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

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.

MOREIRA, S. I.; CERESINI, P. C.; ALVES, E. Reprodução Sexuada em *Pyricularia oryzae*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 175-182, 2015.

NETO, J. J. D.; SANTOS, G. R.; ANJOS, L. M.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Hot spots for diversity of *Magnaporthe oryzae* physiological races in irrigated rice field in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 45, n. 3, p. 252-260, 2010.

NOGUCHI, M. T.; YASUDA, N.; FUJITA, Y. Evidence of genetic exchange by parasexual recombination and genetic analysis of pathogenicity and mating type of parasexual recombinants in rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 96, n. 7, p. 746-750, 2006.

NOTTEGUEM, J. L.; SILUÉ, D. Distribution of mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. *Phytopathology*, St. Paul, v. 82, p. 421-424, 1992.

NUNES, C. D. M.; PARFITT, J. M. B.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; FAGUNDES, P. R. R.; ALVES, Y. S. *Avaliação dos fungicidas no controle da brusone em arroz em sistema de irrigação por aspersão*. 2015. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. *Fundamentos de toxicologia*. 3ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008 p.

O'SULLIVAN, D.; CREUSOT, F.; COOKE, B.M, PHAN, T.H, DRON, M. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Current genetics*, Berlin, v. 33, n. 4, p. 291-298, 1998.

OLIVEIRA, S. C.; CASTROAGUDIN, 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*, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 298-304, 2015.

OLIVEIRA, S.C. *Resistência a fungicidas estrobilurinas em populações de Pyricularia oryzae de trigo no Brasil*. 2014. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Ilha Solteira, 2014.

ONAGA, G.; KERSTIN, W.; KOOPMANN, B.; SÉRÉ, Y.; TIEDERMANN, A Von. Population structure, pathogenicity, and mating type distribution of *Magnaporthe oryzae* isolates from East Africa. *Phytopathology*, St. Paul, v. 105, n. 8, p. 1137-1145, 1992.

OU, H. S.; AYAD, M. R. Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesions and monoconidial cultures. *Phytopathology*, St.Paul, v. 58, n. 1, p. 179-182, 1968.

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

PAGANI, A. P. S. *Resistência do trigo à brusone, manejo químico e diversidade de Magnaporthe grisea*. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

PAGANI, A. P. S.; DIANESE, A. C.; CAFÉ-FILHO, A. C. Management of wheat blast with sunthetic fungicides, partial reistance and silicate and phosphite minerals. *Phytoparasitica*, Dordrecht, v. 42, n. 5, p. 609-617, 2014. Disponível em: <<http://rd.springer.com/journal/12600/42/5/page/1>> . Acesso em: 29 dez. 2015.

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.

PEIXOTO, L. F. *Identificação da compatibilidade, sexualidade, fertilidade e AVR1-CO39 em populações de Pyricularia oryzae, coletadas em lavouras de arroz, no Brasil*. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2014.

PEREIRA, J. F.; CONSOLI, L.; SOUZA B.; ESTEVON, A.; BONATO, A. L. V.; MACIEL, J. L. N. Development of genomic SSR markers and molecular characterization of *Pyricularia oryzae* isolates from wheat in Brazil. *Biochemical Genetics*, New York, v. 52, n. 1-2, p. 52-70, 2013.

PERGHER, G.; GUBIANI, R.; TONETTO, G. Foliar deposition and pesticide losses from three air-assisted sprayers in a hedgerow vineyard. *Crop protection*, Oxford, v. 16, n. 1, p. 25-33, 1997.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. *Doenças em cereais de inverno: aspectos epidemiológicos e controle*. Passo Fundo: CNPT/EMBRAPA, 1995. 58 p.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em lavouras comerciais de trigo (*Triticum aestivum*) no estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 15, n. 1, p. 83-84, 1989.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. *Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas*. 1ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 387 p.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; CASTRO, N. Pathogenic variation among isolates of *Pyricularia oryzae* infecting rice, wheat, and grasses in Brazil. *Tropical Pest Management*, London, v. 38, p. 367-371, 1992.

PURCHIO, A. F.; MUCHOVEJ, J. J. O gênero *Pyricularia* e seus teleomorfos. In: LUZ, W .C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Orgs.) *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 1994. p. 175-208.

RAMOS, H. H. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, p. 275-284, 2000. Suplemento

REGNER, L.; LORETO, E. L. S. Transposons. In: ZAHA, A. (Org.). *Biologia Molecular Básica*. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto. 2003. p. 202-227.

REIS, E. M. Sterilization of heat-labile culture plastic boxes using formaldehyde vapor. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 39, n. 1, p. 63-63, 2013.

REIS, E. M.; BLUM, M. M. C.; FORCELINI, C. A. Sobrevivência de *Pyricularia oryzae* associada a sementes de trigo. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 21, n. 3, p. 43-44, 1995.

REIS, E. M.; DANELLI, A. L. D.; ZOLDAN, S. *Brusone do trigo - ciclo da doença*. 2013. Disponível em: <<http://www.orsementes.com.br>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

REIS, E. M.; LUZ, W. C. Controle químico de doenças do trigo. In: REUNIÃO ANUAL CONJUNTA DE PESQUISA DE TRIGO, 8, 1976, Ponta Grossa. *Anais...* Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1976. v. 4, p. 106-111.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M.A. *Manual de Fungicidas: Guia para o controle químico de doenças de plantas*. Passo Fundo: Editora UPF, 6ed, 2010. 226 p.

REIS, E. M.; ZOLDAN, S.; SOUZA, E. D. *Brusone do trigo – ocorrência de epidemia no Rio Grande na safra 2014*. 2014. Disponível em: <http://www.cultivares.com.br/noticias>. Acesso em 29 dez. 2105.

REIS, E.; REIS, A. C. *Mancozebe*. Passo Fundo: Berthier, 2015. 80 p.

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. Informações técnicas para trigo e triticale – safra 2014. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. 7., 2013. Passo Fundo, *Anais...* Londrina: Fundação Meridional, 2014. p. 235.

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. Informações técnicas para trigo e triticale – safra 2015. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. 8., 2014. Anais... Canela: Embrapa Trigo, 2014. p. 229.

RIBEIRO, K.T; FILIPPO, D.C de; PAIVA, C. L; MADEIRA, J.A; NASCIMENTO J.S. do. Ocupação por *Brachiaria* spp. (Poaceae) no Parque Nacional da Serra do Cipó e infestação decorrente da obra de pavimentação da rodovia MG-010 na APA Morro da Pedreira. Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ESPÉCIES INVASORAS, 1., 2005, Brasília. *Anais...* Brasília: 2005. p. 1-17

RIBOT, C.; HIRSCH, J.; BALZERGUE, S.; THARREAU, D.; NOTTÉGHEM, J. -L.; LEBRUN, M. -H.; MOREL, J. B. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal Plant of Physiology*, Jena, v. 165, n. 1, p. 114–124, 2008.

ROCHA, J. R. A. S. C.; PIMENTEL, A. J. B.; RIBEIRO, G.; SOUZA, M. A. Eficiência de fungicidas no controle da brusone em trigo. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 40, n. 4, p.347-352, 2014.

RODRIGUES, G. J.; TEIXEIRA, M. M. ALVARENGA, C. B. Desempenho operacional de pontas hidráulicas na determinação de parâmetros da pulverização hidropneumática. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 8-15, 2012.

RODRIGUES, G. J.; TEIXEIRA, M. M.; FERNANDES, H. C.; PEREIRA, L. R. Análise da distribuição volumétrica de bicos de pulverização tipo leque de distribuição uniforme. *Engenharia na Agricultura*, Viçosa, v. 12, n. 1, p. 7-16, 2004.

RODRÍGUEZ, J. P. *Sensibilidad a fungicidas de las especies de Fusarium responsables de la pudrición de la mazorca de maíz*. 2014. 68f. Tesis (Dotorado de Fitosanidad) - Colegio de Postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas de Montecillo, Mexico, 2014.

ROMÁN, R., A., A.; CORTEZ, J. W.; FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, J. R. G. Cobertura da cultura da soja pela calda fungicida em função de pontas de pulverização e volumes de aplicação. *Scientia Agraria*, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 223-232, 2009.

RUEDELL, J. *Plantio direto na região de Cruz Alta*. Cruz Alta: FUNDACEP FECOTRIGO, 1995. 134p.

RUSSEL, P. E. *Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management*. In: FRAC. Monograph n° 3, Cambridge, 2004. Disponível em: <<http://www.frac.info/resistance-overview>> Acesso em: 29 dez. 2015.

SAINT-MACARY, M. E.; BARBISAN, C.; GAGEY, M. J.; FRELIN, O.; BEFFA, R.; LEBRUN, M. H.; DROUX, M. Methionine biosynthesis is essential for infection in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PloS One*, San Francisco, v. 10, n. 4, p. 1-22, 2015.

SALEH, D.; MILAZZO, J.; ADREIT, H.; THARREAU D.; FOURNIER E. Asexual reproduction induces a rapid and permanent loss of sexual reproduction capacity in the rice fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*: results of *in vitro* experimental evolution assays. *BMC Evolutionary Biology*, p. 12-42. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/12/42>>. Acesso em: 27 out. 2015.

SALEH, D.; XU, P. S. Y.; LI, C.; ADREIT, H.; MILAZZO, J.; RAVIGNÉ, V.; BAZIN, E.; NOTTÉGHÉ, J.; FOURNIER, E.; THARREAU, D. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology*, Vancouver, v. 21, n. 6, p. 1330-1344, 2012.

SANTANA, F. M.; MACIEL, J. L. N.; LAU, D.; CARGNIN, A.; SEIXAS, C. D. S.; BASSOI, M. C.; GOULART, A. C. P.; SUSSEL, A. A. B.; SCHIPANSKI, C. A.; MONTECELLI, T. D. N.; CHAGAS, J. H.; GUIZELINE, J. *Eficiência de fungicidas para o controle da brusone do trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2011*. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co328.htm>. Acesso em: 29 dez. 2015.

SANTOS, G. R.; NETO, J. J. D.; NASCIMENTO, I. R.; CASTRO, H. G.; NETO, M. D. C. Influência da idade, número de repicagens e coloração dos micélios na esporulação de isolados de *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone em arroz no estado do Tocantins. *Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia*, Guarapuava, v. 3, n. 3, p. 113-118, 2010.

SANTOS, R. O. Deposição de calda fungicida aplicada na cultura da soja, em função de ponta de pulverização e volume de calda. In: JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 1., 2005, Anápolis. *Anais...* Anápolis: Universidade Estadual Goiás, 2005. p. 1-6.

SARI, B. G.; STEFANELO, M. S.; LENZ, S.; COSTA, I. F. D.; ARRUÉ, A.; AUGUSTI, G. R.; PES, M. P. Controle de doenças foliares em trigo com equipamentos de pulverização de baixo volume de aplicação. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 11, p. 1966-1972, 2014.

SAUER, R. Fungizide brauchen "ziehlwasser". *DLL-Agrarmagazin*, München, v. 2, n. 1, p. 76-7, 1999.

SAUPE, S. J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 64, n. 3, p. 489-502, 2000.

SCHEUERMANN, K. K.; EBERHARDT, D. S. Avaliação de fungicidas para o controle da brusone de panícula na cultura do arroz irrigado. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v. 10, n. 1, p. 23-28, 2011.

SCHEUERMANN, K. K. *Análise da variabilidade de Magnaporthe grisea no estado de Santa Catarina*. 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SCHRÖDER, E. P. *Avaliação de deriva e deposição de pulverizações aeroagrícolas na região sul do Rio Grande do Sul*. 1996. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1996.

SCUDELER, F.; BAUER, F.F.; RAETANO, C.G. Ângulo da barra e ponta de pulverização na deposição de pulverização em soja. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO DE AGROTÓXICOS, 3., 2004, Botucatu. *Anais...* Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2004. p. 13-16.

SHEN, W. C.; BOBROWICZ, P.; EBBOLE, D.J. Isolation of pheromone precursor genes of *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, Amsterdam, v. 27, s/n, p. 253-263, 1999.

SILUE, D.; NOTTEGHEM, J. L. Production of perithecia of *Magnaporthe grisea* on rice plants. *Mycological Research*, Cambridge, v. 94, n. 8, p. 1151-1152, 1990.

SOMMERHALDER, R. J.; McDONALD, B. A.; ZHAN, J. The frequencies and spatial distribution of mating types in *Stagonospora nodorum* are consistent with recurring sexual reproduction. *Phytopathology*, St. Paul, v. 96, n. 3, p. 234-239, 2006.

SOUZA, B. O.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, 2007.

SPOLTI, P.; JORGE, B. C.; DEL PONTE, E. M. Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. *Tropical Plant Pathology*, St. Paul, v. 37, n. 6, p. 419-423, 2012.

STAUB, T.; SOZZI, D. Fungicide resistance. *Plant Disease*, St. Paul, v. 86, n. 12, p. 1026-1031, 1984.

STEFANELO, M. S.; SARI, B. G.; LENZ, G.; ARRUÉ, A.; PES, M. P.; COSTA, I. F. D. Caracterização da pulverização de fungicida na cultura do trigo com pontas hidráulicas e atomizadores rotativos de disco. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v. 34, n. 5, p. 1012-1018, 2014.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: A threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, St. Paul, v. 43, p. 83-116, 2005. Supplement

STUCKENBROK, E. H.; MCDONALD, B. A. The Origins of Plant Pathogens in Agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, St. Paul, v. 46, p. 75-100, 2008. Supplement

TAHERI, P.; IRANNEJAD, A. Genetic structure of various *Magnaporthe oryzae* populations in Iran and Uruguai. *Australasian Plant Pathology*, Clayton, v. 43, n. 3, p. 287-297, 2013.

TAKAN, J. P.; CHIPILI, J.; MUTHUMEENAKSHI, S.; TALBOT, N. J.; MANYASA, E. O.; BANDYOPADHYAY, R.; SERE, Y.; NUTSUGAH, S. K.; TALHINHAS, P.; HOSSAIN, M.; BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S. *Magnaporthe oryzae* Populations adapted to finger millet and rice exhibit distinctive patterns of genetic diversity, sexuality and host interaction. *Molecular Biotechnology*, Totowa, v. 50, p. 145-158, 2012.

TATEISHI, H.; MIYAKE, T.; MORI, M.; KIMURA, R.; SAKUMA, Y.; SAISHOJI, T. Sensitivity of Japanese *Fusarium graminearum* species complex isolates to metconazole. *Journal of Pesticide Science*, Tokyo, v. 35, n. 4, p. 419-430, 2010.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, London, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

TEIXEIRA, E. S.; OSIPE, J. P.; GANDOLFO, U. D.; OLIVEIRA, J. F.; GANDOLFO, M. A.; OSIPE, R. Uso de baixo volume oleoso e assistência de ar no controle de plantas daninhas. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 1, p. 1229-1234, 2010.

TEIXEIRA, G. T. *Transmissibilidade de Magnaporthe oryzae por sementes de trigo e deleção e caracterização do gene BIN1 do patógeno*. 2014. 87 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

TEIXEIRA, M. M.; DELGADO, L. M.; FIGUEIREDO, J. L. A. Efeito do volume de pulverização e da população de gotas na eficácia de tratamentos herbicidas, utilizando pulverizadores hidráulicos. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 27., 1998, Poços de Caldas. *Anais...* Poços de Caldas, 1998. p. 115.

THINES, E.; WEBER, R. W.; TALBOT, N. J. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, Rockville, v. 12, n. 9, p. 1703-1718, 2000.

THOMAZELLA, D. P.; TEIXEIRA, P. J.; OLIVEIRA, H. C.; SAVIANI, E. E.; RINCONES, J.; TONI, I. M.; REIS, O.; GARCIA, O.; MEINHARDT, L. W.; SALGADO, I.; PEREIRA, G. A. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytologist*, Bristol, v. 194, n. 4, p. 1025-1034, 2012.

TOLEDO, J. Enfermedades. In: DÍAZ, O.; GUZMÁN, E.; TOLEDO, J.; FRANCO, P.; TERRAZAS, D.; ANTEZANA, A. (Orgs.). *Guía de recomendaciones técnicas del cultivo de trigo*. Santa Cruz: CIAT, 2004. p. 50- 55.

TONIN, R. B.; REIS, E. M.; GÓMEZ, D. E. Sensibilidad a fungicidas *in vitro* de micelios de *Drechslera siccanis* aislada a partir de trigo. *Revista de investigações agropecuárias*, Buenos Aires, v. 41, n. 2, p. 192-200, 2015.

TORRIANI, S. F.; BRUNNER P. C.; MCDONALD, B. A.; SIEROTZI, H. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, Malden, v. 65, n. 2, p. 155-162, 2009.

TOSA, Y.; CHUMA, I. Classification and parasitic specialization of blast fungi. *Journal Genetic Plant Pathology*, St. Paul, v. 80, n. 5, p. 202-209, 2014.

TSUHAKO, A. T. Exportação de sementes tropicais. *Artigos Técnicos*. 2010. Disponível em: <<http://www.matsuda.com.br/matsuda>>. Acesso em: 27 fev. 2016.

TURINA, M.; PRODI, A.; ALFEN, N. K. V. Role of the Mf1-1 pheromone precursor gene of the filamentous ascomycete *Cryphonectria parasítica*. *Fungal Genetics and Biology*, Amsterdam, v. 40, n. 3, p. 242-251, 2003.

UEYAMA, A.; TSUDA, M. Formation of the perfect state in culture of *Pyricularia* sp. from some gramineous plants (preliminary report). *Translaction of the Mycological Society of Japan*, Tokyo, v.16, p. 420-422, 1975.

URASHIMA, A. S.; GALBIERI, R.; STABILI, A. DNA fingerprinting and sexual characterization revealed two distinct populations of *Magnaporthe grisea* in wheat blast from Brazil. *Czech Journal Genetic Plant Breeding*, Slezská, v. 41, s/n, p. 238-245, 2005. Supplement.

URASHIMA, A. S.; KATO, H. Pathogenic relationship between isolates of *Pyricularia grisea* of wheat and other hosts at different host developmental stages. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23, n. 1, p. 30-35, 1998.

URASHIMA, A. S.; LAVORENTI, 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, n. 5, p. 511-518, 2004.

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

URASHIMA, A. S.; IGARASHI, S.; KATO, H. Host Range, Mating Type, and Fertility of *Pyricularia grisea* from Wheat in Brasil. *Plant Disease*, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1211-1216, 1993.

URASHIMA, A. S.; GROSSO, C. R. F.; STABILI, A.; FREITAS, E. G.; SILVA, C. P.; NETTO, D. C. S.; FRANCO, I.; BOTTAN, J. H. M. Effect of *Magnaporthe grisea* on seed germination yield and quality of wheat. In: WANG, G. L.; VALENT, B. (Ed). *Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease*. Berlin: Springer, 2009. p. 267-277.

VALENT, B.; CRAWFORD, M. S.; WEAVER, C. G.; CHUMLEY, F. G. Genetic studies of fertility and pathogenicity in *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*). *Iowa State Journal Research*, Iowa, v. 60, s/n, p. 559-594, 1986.

VELLOSO, J. A. R. O.; GASSEN, D. N.; JACOBSEN, L. A. *Tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas com pulverizadores de barra*. Passo Fundo: Embrapa – CNPT, 1984. 50 p.

VENÂNCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. Physiological effects of estrobilurin fungicides on plants. *Publ. UEPG Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias*, Ponta Grossa, v. 9, n. 3, p. 59-68, 2004.

VIANA, R. G. *Avaliação de pontas de pulverização sob diferentes condições operacionais*. 2006. 42 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

VIJI, G.; GNANAMANICHAM, S. S. Mating type distribution and fertility status of *Magnaporthe grisea* populations from various hosts in India. *Plant Disease*, St. Paul, v. 82, n. 1, p. 36-40, 1998.

VIJI, G.; UDDIN, W. Distribution of mating type alleles and fertility status of *Magnaporthe grisea* causing gray leaf spot of perennial ryegrass and St. Augustinegrass turf. *Plant Disease*, St. Paul, v. 86, n. 8, p. 827-832, 2002.

WANG, F.; LIN, Y.; PENG, Y-L.; SCHNABEL, G.; HUANG, J-B.; LUO, C-X. The Y137H mutation of VvCyP51 gene confers the reduced sensitivity to tebuconazole in *Villosiclava virens*. *Scientific Reports Nature Publishing Group*, London, v. 5, n. 3, 2015.

WANG, X.; LEE, S.; WANG, J.; MA, J.; BIANCO, T.; JIA, Y. Current Advances on Genetic Resistance to Rice Blast Disease. In: YAN, W. *Rice: Germoplasm, Genetics and Improvement*. Hangzhou: China Jiliang University, 2014. p. 195-217. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books>>. Acesso em: 27 out. 2015

WHEELER, I. E.; KENDALL, S. J.; BUTTERS, J.; HOLLOMON, D. W.; HALL, L. Using allele-specific oligonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis*. *Pesticide Science*, New York, v. 43, n. 3, p. 201-209, 1995.

XAVIER, S. A.; KOGA, L. J.; BARROS, D. C. M.; CANTERI, M. G.; LOPES, I. O. N.; GODOY, C. V. Variação da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da desmetilação no Brasil. *Summa phytopathologica*, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 191-196, 2015.

XUE, M.; YANG, J.; LI, Z.; HU, S.; YAO, N.; RALPH, A.; ZHAO, W.; SHEN, M.; ZHANG, H.; LI, C.; LIU, L.; CAO, L.; XU, X.; XING, Y.; HSIANG, T.; ZHANG, Z.; XU, J.-R.; PENG, Y.-L. Comparative analysis of the genomes of two field isolates of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *PLoS Genetics*, San Francisco, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2012.

YAEGASHI, H.; YAMADA, M. Patogenic race and mating type of *Pyricularia grisea* from Soviet Union, China, Nepal, Thailand, Indonesia and Colombia. *Japanese Journal of Phytopathology*, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 225-234, 1986. Supplement.

YAEGASHI, H.; NISHIHARA, N. Production of the perfect stage in *Pyricularia* from cereals and grasses. *Japanese Journal of Phytopathology*, Tokyo, v. 42, n. 4, p. 511-515, 1976.

ZADOCKS, J. C.; SCHEIN, R. *Epidemiology and plant disease management*. New York: Oxford University Press, 1979. 427p.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, Kansas, v. 14, n. 6, p. 415-421, 1974.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. *Manejo de resistência de fungos a fungicidas*. Viçosa: Editora UFV, 2007. 168p

ZEIGLER, R. S. Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, St. Paul, v. 36, p. 249-275, 1998. Supplement.

ZEIGLER, R. S.; SCOTT, R. P.; LEUNG, H.; BORDEOS, A. A.; KUMAR, J.; NELSON, R. J. Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, n. 3, p. 284-294, 1997.

ZHANG, C.; ZHOU, M.; SHAO, Z.; LIANG, G. Detection of sensitivity and resistance variation of *Magnaporthe grisea* to kitazin P, carbendazim and tricyclazole. *Rice Science*, v. 11, n. 5, p. 317-323, 2004.

ZHANG, Y.; SHI, H.; LIANG, S.; NING, G.; XU, N.; LU, J.; LIU, X.; LIN, F. MoARG1, MoARG5,6, and MoARG7 involved in arginine biosynthesis are essential for growth, conidiogenesis, sexual reproduction, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Microbiological Research*, St. Paul, v.180, s/n, p.11-22, 2015.