

SENSIBILIDADE À ESTROBILURINA DE ISOLADOS DE *PYRICULARIA ORYZAE* DO ARROZ NO RIO GRANDE DO SUL

Camila Bedin Scalco¹, Cláudio Ogoshi², Daniel Arthur Gaklik Waldow³, Danielle Almeida⁴, Gabriela de Magalhães da Fonseca⁵

Palavras-chave: Brusone, *Oryza sativa*, azoxistrobina, resistência

Introdução

O Rio Grande do Sul (RS) destaca-se como o maior produtor nacional de arroz, sendo responsável por cerca de 70% do total produzido no Brasil. A brusone, doença causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* Sacc. (forma imperfeita) - *Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr. (forma perfeita), assume posição de doença economicamente importante, pois em anos cujas condições se apresentam como favoráveis, os danos ocasionados por essa podem comprometer até 100% da produção da lavoura de arroz (SOSBAL, 2016). Na safra 2016/2017, aproximadamente 30% da área cultivada com arroz irrigado no estado do RS foi semeada com cultivares suscetíveis à brusone (IRGA, 2017). Mas esse cenário já foi pior, na safra 2014/2015, por exemplo, mais de 2/3 da área foi semeada com genótipos suscetíveis à brusone (IRGA, 2015). A utilização de cultivares resistentes é uma medida efetiva para o controle dessa doença. Entretanto, devido à grande variabilidade genética do patógeno, a resistência introgridida em novas cultivares não é durável (SCHEUERMANN & EBERHARDT, 2011). Atualmente, o controle da brusone depende principalmente da aplicação de fungicidas (CASTROAGUDÍN et al., 2015). Existem hoje 41 fungicidas registrados para o controle da brusone na cultura do arroz (AGROFIT, 2017). Apesar disso, observa-se que, um grupo composto por um número restrito de produtos com sítio específico de ação, como triazóis e estrobilurinas, tem sido utilizado de forma continuada (SCHEUERMANN & EBERHARDT, 2011). Esse fato colabora com o surgimento de novas raças de patógenos resistentes a esses fungicidas (ADAME & KOLLER, 2003). As estrobilurinas pertencem ao grupo dos fungicidas conhecidos como inibidores de quinona oxidase (Qols), os quais interferem na respiração mitocondrial do patógeno bloqueando a transferência de elétrons no citocromo b (codificada pelo gene *cyt b*) (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Em *P. oryzae*, assim como na ampla maioria dos fitopatógenos, a resistência à estrobilurina resulta da alteração de um aminoácido de glicina para alanina no códon 143 do *cyt b*, conhecida como mutação G143A. Outra mutação, a F129L, que ocorre no códon 129 e ocasiona a alteração de fenilalanina para leucina, já foi descrita como causadora de resistência moderada (GISI et al., 2002). Embora mutações que resultem em resistência a fungicidas Qols tenham sido relatadas de forma recorrente e em diferentes genótipos de patógenos de regiões geográficas distintas (OLIVEIRA et al., 2015), o desenvolvimento dessas depende de fatores particulares de cada patossistema (MA et al., 2009). *P. oryzae* apresenta uma ampla gama de hospedeiros. Trigo, triticale e cevada são alguns exemplos de outras culturas que podem apresentar quedas significativas de produtividade devido ao ataque desse patógeno (GALBIERI & URASHIMA, 2008). Alguns autores já descreveram a alta variabilidade genético-patotípica de populações do fungo como possível determinante de eventos de mudança de hospedeiro (MOREIRA et al., 2015). Em 2015, CASTROAGUDÍN e colaboradores publicaram um estudo realizado com 325 isolados de *P. oryzae* infectantes de trigo e de espécies de gramináceas invasoras de

¹ Eng. Agrônoma e Mestre em Biologia Celular e Molecular, IRGA, Av. Bonifácio Carvalho Bernardes 1494, Cachoeirinha-RS, CEP: 94930030, e-mail: camila-scalco@irga.rs.gov.br.

² Eng. Agrônomo e Doutor em Fitopatologia, EPAGRI.

³ Eng. Agrônomo e Mestre em Fitomelhoramento, IRGA.

⁴ Eng. Agrônoma e Doutora em Fitotecnia, IRGA.

⁵ Eng. Agrônoma e Doutora em Fitomelhoramento, IRGA.

lavouras de trigo, os quais foram coletados em sete estados brasileiros incluindo o RS, e verificaram que mais de 90% dos isolados apresentavam mutação no gene *cyt b*, expressando resistência à estrobilurina. Apesar desse relato, dados de pesquisas para acompanhar o nível de sensibilidade e detectar casos de resistência à estrobilurina especificamente em populações gaúchas de isolados de *P. oryzae* de arroz não foram publicados até o momento. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade à estrobilurina em população de isolados de *P. oryzae* coletados em arroz no RS.

Material e Métodos

Para testar a sensibilidade de isolados *P. oryzae* de arroz à azoxistrobina (fungicida Qol) foram utilizados 47 isolados monospóricos provenientes de amostragens realizadas em lavouras de arroz localizadas exclusivamente no estado do RS na safra 2015/2016. O nível de sensibilidade à estrobilurina foi determinado com base na EC_{50} , concentração capaz de causar 50% de inibição de crescimento micelial. Os isolados foram cultivados por 7 dias em placas de Petri contendo batata dextrose-ágar (BDA, Merck) com adição de estreptomicina na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro para produção de inóculo. Para produção de solução de trabalho, o fungicida Priori® (azoxistrobina 250 g/L, Syngenta) foi diluído 100 vezes em água deionizada. O meio de cultura BDA utilizado nos ensaios foi autoclavado e resfriado a aproximadamente 50 °C, em seguida acrescentou-se 80 $\mu\text{g/mL}$ de ácido salicilhidroxâmico (SHAM), o qual é necessário para suprimir a via alternativa da oxidase (MA et al., 2009), e azoxistrobina para atingir as concentrações finais de 0,04; 0,16; 0,32; 1,25; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de ingrediente ativo. O preparo do meio de cultura das placas controle foi igual ao das placas testadas, porém sem adição de azoxistrobina. Discos com 7 mm de diâmetro de micélio foram cortados da borda das colônias inóculo, e posteriormente depositados nas placas de meio BDA acrescidas das diferentes doses de azoxistrobina. Em cada placa de meio de cultura depositou-se discos de 4 isolados de *P. oryzae* diferentes, constituindo uma unidade experimental. Após 5 dias de incubação a 25 °C, o crescimento do diâmetro das colônias foi medido em milímetros e subtraiu-se 7 mm, medida correspondente ao diâmetro do disco micelial original. O crescimento micelial dos isolados nas doses testadas foi convertido em crescimento relativo (CR) por meio da fórmula: $100 \times (\text{diâmetro médio da colônia em meio com fungicida}) / (\text{diâmetro médio da colônia em meio sem fungicida})$. O programa ED50plus v1.0 (VARGAS, 2000) foi utilizado para cálculo dos valores de EC_{50} , no qual trabalhou-se com os CRs de cada isolado e concentrações do fungicida transformadas em logaritmo natural. O delineamento experimental foi de blocos casualizados com quatro repetições. Foi feito teste de resíduos e análise de variância para o EC_{50} com o programa estatístico SAS versão 8.0 (SAS INSTITUTE, 2000). O agrupamento, realizado pelo teste de médias Scott-Knott para cada um dos isolados, foi feito com o programa estatístico SISVAR versão 4.1 (FERREIRA, 2000). A resistência à estrobilurina foi determinada para 3 isolados com base na genotipagem do gene *cyt b*. O DNA dos isolados foi extraído com o *kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®), seguindo instruções do fabricante. Um fragmento de 879 pb do gene *cyt b* foi amplificado por PCR usando os *primers* PgCytb-F1 (5'-AGTCCTAGTGTAAT GGAAGC-3') e PgCytb-R1 (5'-ATCTTCAACGTGTTTAGCACC-3'). Os produtos de PCR foram purificados com o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®) e sequenciados pela empresa ACTGene Análises Moleculares (Porto Alegre, Brasil) utilizando sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®). O programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994) foi utilizado para alinhamento de sequências usando a sequência de DNA AY245424, recuperada do *GenBank*, como referência de isolado sensível. Mutações que conferem resistência à estrobilurina (G143A e F129L) foram buscadas manualmente.

Resultados e Discussão

Por meio desse estudo, observou-se que os isolados apresentam variações quantitativas de sensibilidade à azoxistrobina. Os valores de EC_{50} para azoxistrobina de 47 isolados de *P. oryzae* de arroz coletados em lavouras do RS variaram de $4,71 \cdot 10^{-8}$ a $0,09 \mu\text{g/mL}$ de azoxistrobina. O teste de Scott-Knott classificou os isolados analisados em 3 grupos diferentes: sensibilidade alta, sensibilidade média e sensibilidade baixa (Gráfico 1); sendo que os isolados foram considerados sensíveis à azoxistrobina por apresentarem valores de EC_{50} dentro do intervalo determinado por CASTROAGUDÍN et al. (2015). A EC_{50} média, bem como as maiores e menores EC_{50} de cada grupo estão apresentadas na Tabela 1.

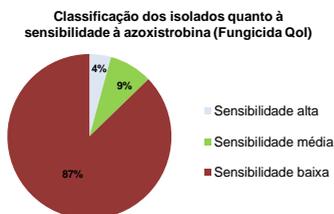


Gráfico 1: Agrupamento de isolados de acordo com o Teste de Scott-Knott.

	Menor EC_{50}	Maior EC_{50}	EC_{50} Média
Sensibilidade alta	$4,71 \cdot 10^{-8}$	$1,01 \cdot 10^{-7}$	$7,43 \cdot 10^{-8}$
Sensibilidade média	$2,39 \cdot 10^{-5}$	$1,95 \cdot 10^{-4}$	$0,95 \cdot 10^{-5}$
Sensibilidade baixa	$7,59 \cdot 10^{-4}$	0,09	0,02

* Dados em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1: EC_{50} média, maior e menor de cada grupo.

No Brasil, aplicações típicas de azoxistrobina variam entre 2,5 a $10 \mu\text{g/mL}$ de i.a. (MAPA, 2017). Entre os isolados analisados nesse estudo, não há qualquer um que apresente EC_{50} igual ou maior à $2,5 \mu\text{g/mL}$ de azoxistrobina, portanto, os níveis de sensibilidade observados foram considerados satisfatórios dando indícios de que, provavelmente, não há no grupo mutantes resistentes à azoxistrobina. Até o momento foram obtidas sequências de DNA correspondentes ao *cyt b* de 3 isolados, sendo que 2 deles apresentaram sensibilidade baixa e 1 com sensibilidade média à azoxistrobina. Conforme esperado, as mutações G143A e F129L não foram encontradas no *cyt b* desses isolados. Esse fato pode estar relacionado, entre outros fatores, com uma capacidade baixa dessa população em desenvolver resistência, com sua taxa de reprodução, com a magnitude da pressão de seleção, com a eficiência da adoção de estratégias anti-resistência, com a qualidade da cobertura da cultura no momento da aplicação do fungicida, e com a velocidade de degradação do fungicida, a qual depende basicamente do clima local.

CASTROAGUDÍN e colaboradores (2015) demonstraram que isolados de *P. oryzae* portadores das mutações G143A e F129L no *cyt b* e, portanto, resistentes à azoxistrobina apresentam EC_{50} em doses maiores que $10 \mu\text{g/mL}$. Para efeito de comparação, a maior EC_{50} detectada nesse trabalho foi em dose aproximadamente 100 vezes menor que $10 \mu\text{g/mL}$, reforçando a hipótese de que, até o momento, não há entre os isolados resistência ao i.a. em estudo. Essa hipótese somente será confirmada quando todos os isolados incluídos no estudo tiverem o *cyt b* genotipado. Apesar de terem sido inúmeros os relatos de resistência às estrobilurinas na última década (Kim et al, 2003), experimentos avaliando a eficácia de fungicidas no controle da brusone, realizados na Estação Experimental do Arroz em Cachoeirinha, RS (EEA/IRGA), na safra 2015/2016, demonstraram que aplicações de fungicidas a base de azoxistrobina em cultivares de arroz sensíveis à brusone resultaram em redução na severidade da doença (dados não publicados), corroborando com os resultados do presente trabalho.

Conclusão

Não houve caso confirmado de resistência à azoxistrobina no grupo de isolados de *P. oryzae* de arroz analisados. Embora tenha sido notado diferentes níveis de sensibilidade à azoxistrobina, aparentemente, o uso de fungicidas QoIs em lavouras de arroz do RS ainda não ocasionou resistência ao patógeno *P. oryzae*.

Referências Bibliográficas

- ADAME, C.A., KOLLER, W. Characterization of spontaneous mutants of Magnaporthe grisea expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current Genetics*, New York, v.42, n. 6, p.332-338, 2003.
- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 26 de maio de 2016.
- CASTROAGUDIN, V.L.; CERESINI, P.C.; OLIVEIRA, S.C.; REGES, J.T A.; MACIEL, J.L.N.; BONATO, A.L.V.; DORIGAN, A.F.; MCDONALD, B.A. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen Magnaporthe oryzae. *Phytopathology*, St. Paul, v.105, n.3, p.284- 294, 2015.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D., TORÉS, J. A., VICENTE, A., PÉREZ-GARCÍA, A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*, Barcelona, v. 11, n.1, p.1-9, 2008.
- FERREIRA, D.F. Sistema de análises de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 2000.
- GALBIERI, R.; URASHIMA, A.S. Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual entre isolados de Pyricularia grisea de diferentes hospedeiros. *Summa Phytopathol*, Botucatu, vol.34 no.1, p.22-28, 2008.
- GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; MCCAFFERY, A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*, West Sussex, v.58, n. 9, p.859-867, 2002.
- IRGA. Cultivares safra 2016/2017. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/upload/20170321160530cultivares_rs_2016_17.pdf>. Acesso em: 23 de maio de 2017.
- IRGA. Programa de pesquisa safra 2014/2015. Cachoeirinha, 312 p. , il, 2015.
- 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.
- 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*., Abingdon, v.31, n. 1, p.57-64, 2009.
- MAPA. Agrofit: Consulta Aberta. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 25 de maio de 2017.
- MOREIRA, S.I.; CERESINI, P.C.; ALVES, E. Reprodução Sexuada em Pyricularia oryzae. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 175-182, 2015.
- OLIVEIRA, S.C.; CASTROAGUDIN, V.L.; MACIEL, J.L.N; PEREIRA, D.A.S; CERESINI, P.S. Resistência cruzada aos fungicidas I Qo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo Pyricularia oryzae no Brasil. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 298-304, 2015.
- SAS Version 8. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 2000.
- SCHEUERMAN, 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.
- SOSBAI - Sociedade Sul-brasileira de Arroz Irrigado. XXXI Reunião Técnica da Cultura do Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Editora SOSBAI, Pelotas, 200 p., il, 2016.
- THOMPSON,J.D; HIGGINS, D.G; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.*, v.22, n.22, p.4673–4680, 1994.
- VARGAS, M.H. ED50plus v1.0. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico DF, Mexico, 2000.