

CARLOS AUGUSTO DÓREA BRAGANÇA

SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Hemileia vastatrix* A AZOXISTROBINA E
TEBUCONAZOL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

B813s
2010

Bragança, Carlos Augusto Dórea, 1984-
Sensibilidade de isolados de *Hemileia vastatrix* a
azoxistrobina e tebuconazol / Carlos Augusto Dórea
Bragança. – Viçosa, MG, 2010.
vii, 35f : il. ; 29cm.

Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 28-35.

1. Fungicidas - Testes. 2. *Hemileia Vastatrix*.
3. Ferrugem-do-cafeeiro. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 632.4

CARLOS AUGUSTO DÓREA BRAGANÇA

SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Hemileia vastatrix* A AZOXISTROBINA E
TEBUCONAZOL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de Fevereiro de 2010.

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Co-orientador)

Prof. Laércio Zambolim
(Co-orientador)

Prof. Sérgio Hermínio
Brommonschenkel

Dr. Robson José do Nascimento

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Orientador)

À Maria Anitha Melo Bragança

À Fernanda Cristina Moreira Melo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Augusto Cerqueira Bragança e Rosana Souza Dórea.

As minhas avós Maria de Lourdes Cerqueira Bragança e Vanda de Oliveira Melo.

À Fernanda Cristina Moreira Melo, pelo apoio, incentivo e carinho.

À toda a minha família.

Ao Professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti pela orientação, incentivo, amizade e pelos ensinamentos valiosos.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos, pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao Nivaldo Sérgio Milagres pela ajuda nas coletas em campo.

Ao Professor Laércio Zambolim por disponibilizar o veículo para as coletas e pela co-orientação.

Ao Professor Luiz Antonio Maffia pela co-orientação, críticas e sugestões.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel pelas críticas e sugestões.

Ao Dr. Robson José do Nascimento pela amizade, críticas e sugestões.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.

BIOGRAFIA

Carlos Augusto Dórea Bragança, filho de José Augusto Cerqueira Bragança e Rosana Souza Dórea, nasceu em Salvador – BA, no dia 26 de Janeiro de 1984.

Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em 2007.

Em Março de 2008 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. Introdução.....	1
2. Material e métodos.....	5
2.1. Obtenção dos isolados de <i>Hemileia vastatrix</i>	5
2.2. Multiplicação e armazenamento dos isolados de <i>Hemileia vastatrix</i>	6
2.3. Teste de sensibilidade a azoxistrobina e tebuconazol.....	7
2.3.1. Teste de sensibilidade a azoxistrobina.....	7
2.3.2. Teste de sensibilidade a tebuconazol.....	8
2.4. Análise molecular para detecção de isolados resistentes a azoxistrobina e tebuconazol.....	9
2.4.1. Extração de DNA.....	9
2.4.2. Análise molecular.....	10
2.4.3. Sequenciamento.....	12
2.4.4. Análises estatísticas.....	13
3. Resultados.....	14
3.1. Sensibilidade de isolados de <i>H. vastatrix</i> a azoxistrobina	14
3.2. Sensibilidade de isolados de <i>H. vastatrix</i> a tebuconazol	17
3.3. Amplificação parcial e sequenciamento dos genes <i>CYTB</i> e <i>CYP51</i>	19
4. Discussão.....	21
5. Conclusões.....	27
6. Referências bibliográficas.....	28

RESUMO

BRAGANÇA, Carlos Augusto Dórea, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Sensibilidade de isolados de *Hemileia vastatrix* a azoxistrobina e tebuconazol.** Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-Orientadores: Luiz Antonio Maffia e Laércio Zambolim.

O monitoramento da sensibilidade de patógenos a fungicida é etapa necessária para compreender os processos associados ao surgimento da resistência, a distribuição de isolados resistentes, a evolução de populações insensíveis e seus impactos no controle das doenças. O manejo da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), doença mais destrutiva desta cultura, é baseado no controle químico, porém não havia informações quanto à sensibilidade do patógeno a fungicidas. Coletaram-se isolados de *H. vastatrix* nas principais regiões produtoras de Minas Gerais e Espírito Santo, e determinou-se a sensibilidade dos isolados aos fungicidas azoxistrobina e tebuconazol, por meio da estimativa da dose efetiva para inibir 50% da germinação ou crescimento do patógeno (DE₅₀). Os valores de DE₅₀ variaram entre 0,004 e 0,12 µg/ml para azoxistrobina e 0,01 a 5,11 µg/ml, para tebuconazol. Não houve associação dos valores de DE₅₀ com a procedência dos isolados ou com o histórico de aplicação de fungicidas, tanto para azoxistrobina ($\chi^2 = 0,63$; $P=0,42$ e $\chi^2 = 0,15$; $P=0,70$) quanto para tebuconazol ($\chi^2 = 3,23$; $P=0,20$ e $\chi^2 = 0,24$; $P=0,89$). Não houve correlação entre distância geográfica e DE₅₀ dos fungicidas. Portanto, não houve evidência de agrupamento espacial quanto à sensibilidade dos isolados aos dois fungicidas. Ambos, azoxistrobina e tebuconazol, reduziram a germinação e alongação do tubo germinativo. Não foi possível amplificar e sequenciar fragmento do gene CYP51 relacionadas à redução da sensibilidade de tebuconazol. Para azoxistrobina, obteve-se sequência parcial do gene *CYTB*, porém, em conformidade com o teste fenotípico, não se constataram as mutações que conferem insensibilidade ao fungicida. Não há evidência de resistência de *H. vastatrix* aos fungicidas azoxistrobina e tebuconazol nas populações de Minas Gerais e Espírito Santo.

ABSTRACT

BRAGANÇA, Carlos Augusto Dórea, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Sensitivity of *Hemileia vastatrix* to the fungicides azoxystrobin and tebuconazole.** Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-Advisers: Luiz Antonio Maffia and Laércio Zambolim.

Monitoring the sensitivity of pathogens to fungicides is a crucial step to understand the processes associated with resistance build-up, distribution of resistant isolates, the evolution of insensitive populations, and the impacts on disease control. The management of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*), the most destructive coffee disease, is based on chemical control, however there was no information about sensitivity of *H. vastatrix* to fungicides. Isolates of *H. vastatrix* were collected in the main producing regions of Minas Gerais and Espírito Santo states, and the sensitivity to azoxystrobin and tebuconazole was determined by estimating either the effective dose to inhibit 50% germination or fungal growth (ED₅₀). The ED₅₀ values for azoxystrobin varied between 0.004 and 0.12 µg/ml and for tebuconazole between 0.01 to 5.11 µg/ml. There was no association of ED₅₀ values with isolate origin or fungicide regimes for both azoxystrobin ($\chi^2 = 0.63$; $P=0.42$ e $\chi^2 = 0.15$; $P=0.70$) and tebuconazole ($\chi^2 = 3.23$; $P=0.20$ e $\chi^2 = 0.24$; $P=0.89$). There was no association between geographic distance and ED₅₀ values, therefore there was no spatial clustering of sensitivity of isolates to both fungicides. Both fungicides reduced germination and germ tube elongation. The primers used did not allow amplification and sequencing of the genomic regions associated with tebuconazole action site in the pathogen. For azoxystrobin, partial sequence was obtained for the *CYTB* gene, but, consistent with the results from the phenotypic test, no mutations known to confer fungicide insensitivity were detected. There is no evidence of resistance in *H. vastatrix* to both azoxystrobin and tebuconazole.

1. Introdução

A ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é doença causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk., e um dos problemas fitossanitários mais destrutivos dessa cultura. A primeira epidemia severa de ferrugem ocorreu no Sri Lanka em 1869 e desde então, a doença passou a ocorrer em vários países e atualmente encontra-se disseminada em todas as principais áreas cafeeicultoras (Van der Vossen, 2005). A ferrugem pode causar perdas de até 30% da produção quando medidas de controle não são corretamente implementadas (Kushalappa & Eskes, 1989b).

A ferrugem deve ser controlada no contexto do manejo integrado, com o uso de controle genético e químico. O cultivo de variedades resistentes é a medida de controle mais desejável, considerando-se os aspectos técnicos, econômicos e ecológicos. Porém, a alta variabilidade genética das populações de *H. vastatrix* no Brasil dificulta a implementação em larga escala espaço-temporal de variedades resistentes (Maia, 2009; Nunes et al., 2009; Várzea & Marques, 2005; Zambolim et al., 2005). Além disso, há poucos cultivares resistentes à ferrugem com boas características agronômicas. Práticas de controle cultural são pouco empregadas e raramente contribuem de maneira expressiva para a redução da intensidade da ferrugem. O uso de fungicidas protetores e sistêmicos é o principal método de controle da doença. Atualmente, nas distintas regiões do país, principalmente naquelas onde as lavouras são conduzidas com elevado padrão técnico, há maior dependência de aplicações de fungicidas para reduzir os danos decorrentes da ferrugem (Zambolim et al., 1997; 2005).

Para o controle de ferrugem, preconiza-se o uso de fungicidas cúpricos ou de sistêmicos. Esses últimos podem ser aplicados via foliar ou solo (Cunha et al., 2004). Os fungicidas cúpricos são interessantes por contribuírem com a manutenção de bons níveis nutricionais de cobre, controlarem outras doenças, retardarem a desfolha e, possivelmente, mantêm o potencial produtivo da cultura (Cunha et al., 2004). Porém, como o controle efetivo da ferrugem demanda várias aplicações, muitos produtores optam pelo uso de fungicidas sistêmicos, com menor número de aplicações (Zambolim et al., 2007).

Os fungicidas sistêmicos do grupo dos inibidores de quinona externa (IQE), especificamente as estrobilurinas, e os do grupo inibidores de demetilação (IDM), mais especificamente os triazóis, são amplamente utilizados na agricultura, pois têm amplo espectro de ação contra patógenos (Köller, 1999). Há diversos fungicidas IQE e IDM registrados para o controle da ferrugem do cafeeiro, como o triadimenol, tebuconazol, epoxiconazol, ciproconazol, metconazol, azoxistrobina, piraclostrobina entre outros (AGROFIT, 2010), formulados isoladamente ou em misturas (Zambolim et al., 2002). Tanto os IQE quanto os IDM possuem mecanismo de ação de sítio único: os IQE afetam a respiração, pelo bloqueio da transferência de elétrons, e os IDM interferem na biossíntese de ergosterol, que é essencial para manutenção das funções da membrana celular (Köller, 1999). Em vista do mecanismo de ação sítio-específico, há risco de surgimento de isolados resistentes a esses compostos.

O risco de surgimento e a seleção de indivíduos resistentes aos fungicidas IQE e IDM são conhecidos. Há relatos de resistência aos IQE's em vários patógenos e locais (Délye et al., 1997; Fernández-Ortuño et al., 2006; Ishii et al., 2001; Kim et al., 2003b; Stergiopoulos et al., 2003). Diversos mecanismos de resistência a esses fungicidas foram elucidados, como por exemplo, a mutação no sítio G143A ou

F129L do gene citocromo b (cytochrome b – *CYTB*) (Fernández-Ortuño et al., 2008b). Acredita-se que a sensibilidade das ferrugens a estrobilurina se deve à estrutura do *CYTB*. A presença de um íntron do tipo I após a glicina na posição 143 do *CYTB* dificultaria a permanência de mutantes na população, caso houvesse mutação nesta posição. Nos mutantes, o *splicing* do íntron seria afetado e haveria erro na tradução do citocromo b (Grasso et al., 2006). Há relato na literatura de perda da sensibilidade de *Puccinia horiana* a azoxistrobina, mas o mecanismo de resistência envolvido não foi investigado no âmbito molecular (Cook, 2001).

Os principais mecanismos envolvidos na perda de sensibilidade a triazóis são a maior expressão devido a uma sequência repetida em tandem na região promotora (Hamamoto et al., 2000) ou a mutação Y137F do gene *CYP51* (14 α -demetilase – *CYP51*) (Délye et al., 1997) e a maior expressão dos transportadores ABC (Hayashi et al., 2002). Há relatos de perda de sensibilidade de *Puccinia horiana*, *P. recondita* e *P. triticina* a propiconazol, procloraz e epoxiconazol, respectivamente (Cook, 2001; Kim et al., 2003b; Stammer et al., 2009). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na perda de sensibilidade ainda não foram esclarecidos.

Apesar de os patógenos causadores de ferrugem serem considerados como de médio risco quanto à resistência a fungicidas (Brent & Hollomon, 2007a), alguns aspectos do patossistema *H. vastatrix* x cafeeiro podem contribuir para aumentar as chances de a resistência ocorrer. O patógeno é geneticamente variável e produz grande quantidade de esporos, facilmente dispersos pelo vento. Como o cafeeiro é perene e é cultivado como monocultura em vastas extensões geográficas, vários ciclos de vida do patógeno podem ocorrer ao longo do ano (Avelino et al., 2004; Kushalappa & Eskes, 1989a; Maia, 2009; Várzea & Marques, 2005). Em geral, há

poucos trabalhos de monitoramento da resistência de fungos fitopatogênicos a fungicidas. As técnicas empregadas são laboriosas e, no caso de organismos biotróficos, demandam maior disponibilidade de espaço e tempo e de boas condições de armazenamento das culturas. Na tentativa de minorar estes problemas, técnicas moleculares baseadas nos mecanismos de resistência elucidados vêm sendo utilizadas nos estudos de resistência aos fungicidas. Neste particular, o uso da PCR em tempo real possibilitou o aumento da eficiência da avaliação da sensibilidade de populações de fungos fitopatogênicos a fungicidas (Brent & Hollomon, 2007b). Uma vez desenvolvidos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos, pode-se automatizar grande parte da análise da sensibilidade.

O monitoramento da resistência de fungos a fungicidas, quando feito antecipadamente, além de permitir a detecção de alelos resistentes no campo, quando ocorrerem, pode determinar a frequência desses alelos evidenciando, ou não, um processo de seleção. Com estas informações, pode-se evitar a detecção tardia de problemas de resistência e podem se desenvolver procedimentos rápidos de detecção e quantificação da resistência em populações. Nenhum trabalho de levantamento de ocorrência e monitoramento da distribuição de isolados de *H. vastatrix* resistentes a fungicidas foi realizado no Brasil. Em vista da inexistência de informações, esse trabalho objetivou: *i.* avaliar a sensibilidade de *H. vastatrix* a azoxistrobina e tebuconazol nas principais regiões cafeeicultoras dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo; e *ii.* desenvolver *primers* específicos para futuros trabalhos de monitoramento da sensibilidade do patógeno a triazóis e estrobilurinas com o uso da PCR em tempo real.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção dos isolados de *Hemileia vastatrix*

Setenta e dois isolados de *H. vastatrix* foram obtidos de folhas com infecção moderada, apresentando sintomas e sinais característicos da ferrugem, e coletadas em diferentes municípios produtores de café dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Figura 1). Em cada lavoura, efetuou-se amostragem aleatória. Cada ponto amostrado foi geo-referenciado com aparelho portátil de sistema de posicionamento global (GPS). As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados e transportadas para o laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos, do Departamento de Fitopatologia da UFV, em caixa de isopor.

Os urediniósporos foram coletados das pústulas com auxílio de coletor de esporos, tipo ciclone, acoplado a um tubo plástico esterilizado. Uma amostra consistiu de urediniósporos coletados de todas as pústulas das folhas de cada ponto coletado. Após a coleta, preparou-se suspensão com 1×10^4 urediniósporos/ml (em 0,05% de Tween 20) de cada amostra para inoculação em mudas de cafeeiro da variedade suscetível Catuaí vermelho, cultivadas em casa-de-vegetação. As suspensões de esporos foram atomizadas com auxílio de pulverizador “Pasche tamanho 3” acoplado à bomba compressora, sendo toda a superfície abaxial dos dois últimos pares de folhas coberta pela suspensão de inóculo (Guzzo et al., 2009).

Após a inoculação, as mudas foram levadas para câmara de nevoeiro (umidade relativa > 90%) e mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ na ausência de luz. Após 72 h, as plantas foram transferidas para compartimentos individualizados revestidos por plástico (50 cm de comprimento x 40 cm de largura x 60 cm de altura) e mantidos

em casa-de-vegetação com ajuste de temperatura para 24°C. As plantas permaneceram nesta condição até o aparecimento de pústulas (Guzzo et al., 2009).



Figura 1. Mapa do Brasil com indicação dos locais de coleta dos isolados de *Hemileia vastatrix* utilizados nos testes de determinação de sensibilidade aos fungicidas azoxistrobina e tebuconazol.

2.2. Multiplicação e armazenamento dos isolados de *Hemileia vastatrix*

Para a multiplicação dos isolados, os esporos produzidos nas plantas inoculadas em 2.1 foram reinoculados em novas mudas de Catuaí Vermelho para aumentar o número de pústulas e a quantidade de urediniósporos. Após o período latente, cerca de 30 dias após a inoculação, os urediniósporos foram coletados, como descrito em 2.1, e transferidos para microtubos previamente identificados, congelados em nitrogênio líquido e imediatamente transferidos para congelador a -80°C, onde permaneceram armazenados (Capucho et al., 2005).

2.3. Teste de sensibilidade a azoxistrobina e tebuconazol

Os procedimentos para a determinação da sensibilidade a azoxistrobina e tebuconazol foram adaptados de metodologias descritas para *Phakopsora pachyrhizi* e *Mycosphaerella graminicola* recomendadas pelo Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas (*Fungicide Resistance Action Committee – FRAC*) (Buzzerio, 2006; Stammler, 2009). Para evitar problemas relativos à perda de poder germinativo, os esporos foram coletados de plantas inoculadas imediatamente antes do preparo da suspensão e instalação dos ensaios.

2.3.1. Teste de sensibilidade a azoxistrobina

Adaptou-se metodologia preconizada pelo FRAC para determinação da sensibilidade a azoxistrobina, que considera o principal modo de ação do fungicida: inibição da germinação de esporos (Buzzerio, 2006; Stammler, 2009). Em cada poço de placas de ELISA, depositaram-se 200 µl de meio ágar - água (1%) suplementado de 0; 0,068; 0,136; 0,204; 0,272 ou 0,34 µg/ml para azoxistrobina, obtido a partir do produto comercial Priori[®] SC (25% de azoxistrobina) diluído em acetona. Previamente, conduziram-se testes de germinação para avaliar a sensibilidade dos urediniósporos às concentrações de 0,01; 0,1 e 0,5% de acetona. Para o experimento, diluiu-se os fungicida em acetona a 0,1% (Olaya and Köller, 1999). A testemunha consistiu de solução de acetona a 0,1% incorporada ao meio.

Distribuíram-se 30 µL de suspensão (10^4 urediniósporos/ml e 0,05% de Tween 20) de cada isolado, em cada poço de placas plásticas (tipo ELISA). Uma placa continha uma concentração do fungicida e todos os 72 isolados. Após a

deposição da suspensão de urediniósporos, as placas foram cobertas com filme PVC, para evitar evaporação da suspensão, e mantidas a 22°C, no escuro. Após 72 h, determinou-se o percentual de germinação de 50 urediniósporos em cada poço, sob microscópio (100X). Considerou-se germinado o urediniósporo cujo tubo germinativo tinha comprimento igual ou superior ao diâmetro. O percentual da germinação dos isolados foi ajustado utilizando a fórmula de Abbott, que leva em consideração a mortalidade natural na testemunha (Hubert, 1992).

2.3.2. Teste de sensibilidade a tebuconazol

Para determinar a sensibilidade de 50 isolados ao tebuconazol foram utilizadas placas de ELISA contendo suspensões de esporos. Cada poço da placa continha 60 µl de suspensão a 2×10^4 urediniósporos/ml de cada isolado e 0,05% de Tween 20, acrescido de 40 µl do fungicida nas concentrações 0,1; 0,3; 1; 3; e 10 µg/ml diluídos em 0,1% de metanol, de acordo com avaliação preliminar do efeito da concentração do solvente na germinação. Em cada placa, havia dois controles, cada um representado com 100 µl da mesma solução do fungicida utilizado na placa em 0,05% de Tween 20. As placas foram cobertas com filme PVC e mantidas a 22°C por 72 h no escuro (Stammler, 2009).

Como os IDM inibem crescimento micelial, estimou-se a elongação do tubo germinativo de urediniósporos de *H. vastatrix* indiretamente pela medida da absorbância a 592 nm da suspensão, em cada poço. A absorbância foi medida com leitora de microplacas Thermo Plate (Stammler, 2009). Após obtenção dos valores de absorbância, a espessura e o comprimento do tubo germinativo de cinco isolados tomados ao acaso foram utilizados para determinar a área do tubo germinativo, pela

fórmula $2\pi rh$ (r = metade da espessura do tubo e h = comprimento do tubo). Realizaram-se 10 mensurações para cada repetição de cada tratamento. O valor médio da área do tubo germinativo de cada repetição e o seu respectivo valor de absorvância foram submetidos à análise de regressão e correlação de Pearson.

Após constatação da correlação positiva entre os valores de absorvância e área do tubo germinativo, os valores de absorvância foram ajustados em relação à média da testemunha, transformados em percentagem e plotados em função da concentração de fungicidas.

2.4. Análise molecular para detecção de isolados resistentes a azoxistrobina e tebuconazol

2.4.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de 5 mg de urediniósporos de cada isolado, que foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em microtubos com 5 mg de areia fina esterilizada. Em cada microtubo contendo o macerado, adicionaram-se 800 μ l do tampão SDS (SDS 3%; Tris 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM e β -mercaptoetanol 2%) a 65°C. A mistura foi mantida a 65°C em banho-maria por 1 h e a cada 15 min homogeneizada por inversões. Submeteram-se os microtubos à centrifugação (8 min a 14.000 rpm e 4°C) e transferiram-se 400 μ l do sobrenadante para novos tubos contendo o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, v/v). A mistura foi homogeneizada por 2 min e centrifugada a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos contendo 500 μ l de

clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v). As amostras foram submetidas às mesmas condições de centrifugação para formação e coleta de aproximadamente 500 µl da fase superior. Em novos microtubos, o volume coletado foi misturado a 500 µl de isopropanol frio e 15 µl de acetato de sódio (3,0 M, pH 7,0) e mantidos a -20 °C. Após 24 h, centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min a 4°C para obtenção do *pellet*, que foi ressuspensão em etanol 70% e centrifugado por duas vezes. Após secagem à temperatura ambiente, o *pellet* foi ressuspensão em 40 µl de TE (Tris 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) contendo RNase (50mg/µl), incubando-se a 37°C por 30 min. As amostras de DNA foram coradas com GelRed™ e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a quantidade e qualidade do DNA. A quantificação foi realizada por comparação com marcador de massa lambda (Ludwig Biotec®) na concentração de 100 ng (Dellaporta et al., 1983).

2.4.2. Análise molecular

Com base na sequência parcial do gene *CYTB* de *H. vastatrix* depositada no GenBank, cinco *primers* foram desenhados para detectar as mutações F129L e G143A, que conferem resistência a estrobilurinas (Tabela 1). Além desses, utilizou-se um *primer* direto descrito para *H. vastatrix* (Grasso et al., 2006). O programa utilizado para desenho dos *primers* foi o Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). A combinação HvCYTB-f5/HvCYTB-r4 foi utilizada para detectar a mutação F129L, enquanto as combinações HvCYTB-f3/HvCYTB-r1, HvCYTB-f4/ HvCYTB-r1 e HvCYTB-f3/HvCYTB-r2, para detectar a mutação G143A. As reações de amplificações foram realizadas em termociclador MyGene™, com gradiente da temperatura de anelamento variando de 50 a 68°C. Cada reação de amplificação, com

volume final de 50 µl, continha de 20 a 60 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada *primer*, 2,5 mM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* (DNA polimerase), 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 1,5 mM de MgCl₂. As condições para amplificação foram de 94°C/1 min, seguido de 35 ciclos a 94°C/30 s, 60 ± 10°C /30 s, 72°C/2 min, e extensão final a 72°C/5 min.

A estratégia adotada para detectar a mutação Y137F que confere resistência ao tebuconazol foi a utilização de *primers* descritos para *Puccinia triticina* (KES-845-F/KES-837-R) (Sammler et al., 2009). Adicionalmente, desenharam-se outros *primers* a partir de sequências totais do gene *CYP51* de basidiomicetos que apresentaram o códon que codifica a tirosina na posição 137. Devido ao polimorfismo da região desejada, foram desenhados três *primers* degenerados (Tabela 1) com o auxílio do programa CODEHOP (Rose et al., 1998). O *primer* degenerado HvdCYP51-f foi utilizado em combinação com o reverso HvdCYP51-r1 ou HvdCYP51-r2.

Cada reação de amplificação, com volume final de 25 µl, continha de 20 a 60 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada *primer*, 2,5 mM de cada dNTP, 2,5 U de *taq* (DNA polimerase), 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 1,5 mM de MgCl₂. As condições para amplificação foram de 94°C/1 min, seguido de 40 ciclos a 94°C/30 s, 50 ± 10°C/30 s, 72°C/2 min, e extensão final a 72°C/5 min.

Os produtos amplificados foram corados com GelRed™ e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação do tamanho dos fragmentos por comparação com o marcador de 100 pb (Ludwig Biotec®).

Tabela 1. *Primers* utilizados para detectar as mutações nos genes *CYP51* e *CYTB* de *Hemileia vastatrix*.

Nome do <i>primer</i>	Região de amplificação	Sequência do <i>primer</i>
HvdCYP51-f	Gene <i>CYP51</i>	5'-TGCTACAACAGGAGGATGTACAtgyrsngngtg -3'
HvdCYP51-r1		5'-AAGCACAACATCCACATGTAgncncngtngc-3'
HvdCYP51-r2		5'-CCTCCTCCACAACAAGCTccnsmnccrca-3'
KES-845-F*		5'-GTCCACGATGTCTTCTGTGATC-3'
KES-837-R*		5'-TCAGAGATGGTTTCTTCGAGTAA-3'
HvCYTB-f3	Gene <i>CYTB</i>	5'-GTCGGTTCTATGCAGGATCG-3'
HvCYTB -f4		5'-CCATAGAACAACGACTAAAACAAGC-3'
HvCYTB -f5**		5'-TGCTAATGTGGCTTCATTTTTTC- 3'
HvCYTB -r1		5'-TCGTGATCGTGTGGACATTT-3'
HvCYTB -r2		5'-GCTAGAGCAAGTGGTGTTAGGAA-3'
HvCYTB-r4		5'-AAGGTGTCCACGAAAACGAC-3'

**Primers* desenhados para detecção da mutação Y137F em *Puccinia triticina* (Stammler et al., 2009).

** *Primer* desenhado para o gene *CYTB* de *Hemileia vastatrix* (Grasso et al., 2006).

2.4.3 - Sequenciamento

Para determinar as sequências de nucleotídeos amplificadas a partir do gene *CYTB* de *H. vastatrix*, os *amplicons* foram submetidos à purificação com o kit E.Z.N.A[®] Cycle-Pure e ajustados para concentração de 50 ng/μl. As amostras foram sequenciadas na empresa MACROGEN, Coreia do Sul.

As sequências direta e reversa de cada isolado foram editadas manualmente com o *software* Staden Package para obtenção do “*contig*” (Staden, 1996). Para verificar a similaridade entre as sequências depositadas no GenBank e a obtida no sequenciamento, realizou-se alinhamento local utilizando o BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) (Altschul et al., 1990). Adicionalmente, verificou-se a presença de ORFs (*open reading frame*) e a fase de leitura das sequências no *software* ORFfinder (NCBI, 2010). As sequências foram alinhadas com auxílio do *software* ClustalW na interface do programa MEGA4 (Kumar et al., 2008).

2.4.4. Análises estatísticas

Os testes fenotípicos de sensibilidade aos fungicidas foram realizados em delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 72 (isolados) x 6 (doses) e 50 (isolados) x 6 (doses) para azoxistrobina e tebuconazol, respectivamente. Cada combinação de fatores foi avaliada em cinco blocos. Uma placa de ELISA, com todos os isolados constituiu um bloco e o volume de suspensão contido em cada poço foi considerado como uma unidade experimental.

A DE_{50} , dose efetiva de azoxistrobina para inibição da germinação de 50% dos urediniósporos ou de tebuconazol para inibição de 50% da elongação do tubo germinativo, foi calculada por meio da regressão entre os percentuais de urediniósporos germinados ou dos valores de absorbância pelo logaritmo das concentrações dos fungicidas, respectivamente (Buzzerio, 2006; Stammler, 2009).

Efetuiu-se o cálculo da frequência dos isolados nas classes de DE_{50} média para cada fungicida. As hipóteses H1, associação entre a sensibilidade e procedência dos isolados, Minas Gerais e Espírito Santo, e H2, associação entre a sensibilidade e fungicida aplicado, foram testadas por meio da prova de independência Qui quadrado (χ^2) ao nível de 1% de probabilidade.

Para verificar a correlação entre as matrizes de distância geográfica e valores médios de DE_{50} , para cada fungicida, aplicou-se o teste de Mantel com 1000 permutações. A matriz de distância das DE_{50} médias foi calculada a partir da distância de Mahalanobis. As análises estatísticas e a confecção de mapas foram realizadas com o programa R (R Development Core Team, 2009).

3. Resultados

3.1. Sensibilidade de isolados de *Hemileia vastatrix* a azoxistrobina

Os valores de DE₅₀ para azoxistrobina variaram entre 0,004 e 0,12 µg/ml (Figura 2). Os valores de DE₅₀ relativos aos isolados provenientes de ambos os estados foram distribuídos nas classes de 0 a 0,01 e de 0,11 – 1,0 µg/ml. Para a maioria (90,2%) dos isolados, os valores de DE₅₀ estavam no intervalo da primeira classe (Figura 2a). Não houve diferença significativa entre a distribuição da frequência e a procedência dos isolados ($\chi^2 = 0,63$; $P=0,42$), portanto não houve diferença na DE₅₀ entre os estados amostrados.

Isolados coletados em campos com histórico de aplicação de estrobilurinas foram tão sensíveis quanto aqueles expostos a outros fungicidas ou provenientes de campos em que não se empregaram fungicidas ($\chi^2 = 0,15$; $P=0,70$) (Tabela 2) (Figura 2c).

Urediniósporos de 28 isolados, oriundos de ambos os estados, germinaram nas concentrações mais altas de azoxistrobina (0,272 e 0,340 µg/ml). Em todos os casos, houve redução da espessura e do comprimento do tubo germinativo, e a germinação relativa variou de 2,3 a 28,5 % (Figura 3).

Não houve correlação entre as distâncias geográficas e DE₅₀ média relativa aos isolados. O coeficiente de correlação estimado por meio do teste de Mantel foi 0,14 ($P = 0,06$).

Tabela 2. Código e origem de isolados de *Hemileia vastatrix* obtidos de lavouras de café, com diferentes históricos de aplicação de fungicidas, dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo.

Isolado	Local de Coleta	Fungicida aplicado	Teste*
HV 01	Viçosa-MG	azoxistrobina	AT
HV 02	Viçosa-MG	azoxistrobina	A
HV 03	Viçosa-MG	azoxistrobina	A

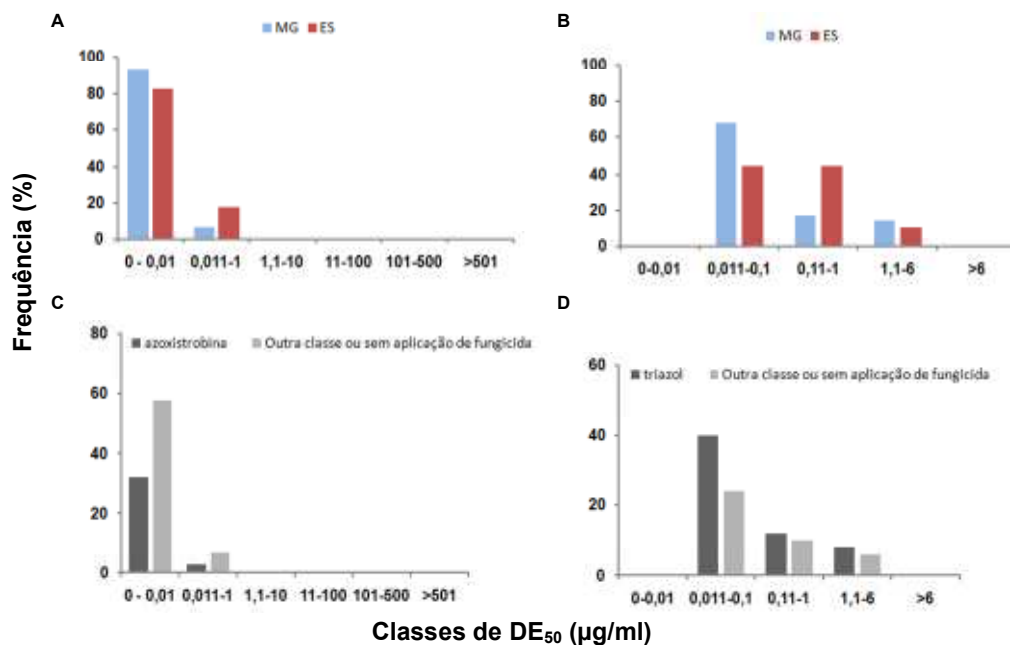
HV 04	Viçosa-MG	azoxistrobina	AT
HV 05	Vila Valério-ES	flutriafol	AT
HV 06	Vila Valério-ES	sem controle	A
HV 10	Iúna-ES	futriafol	AT
HV 12	Ibatiba-ES	flutriafol	AT
HV 14	Ibitirama-ES	sem informação	A
HV 15	Jerônimo Monteiro-ES	sem informação	AT
HV 17	Irupi-ES	sem informação	A
HV 18	Ibatiba-ES	sem informação	AT
HV 19	Irupi-ES	sem informação	A
HV 20	Ibitirama-ES	ciproconazol	AT
HV 21	Iúna-ES	flutriafol	A
HV 22	Irupi-ES	ciproconazol	T
HV 23	Ibitirama-ES	sem informação	AT
HV 25	Elói Mendes-MG	ciproconazol	AT
HV 27	Elói Mendes-MG	ciproconazol	AT
HV 29	Paraguaçu-MG	azoxistrobina + ciproconazol	AT
HV 30	Paraguaçu-MG	azoxistrobina + ciproconazol	AT
HV 33	Machado-MG	trifloxistrobina/ciproconazol + triadimenol	AT
HV 34	Alfenas-MG	epoxiconazol	AT
HV 35	Campos Gerais-MG	epoxiconazol + hidróxido de cobre	AT
HV 36	Campos Gerais-MG	epoxiconazol + hidróxido de cobre	A
HV 37	Campos Gerais-MG	epoxiconazol + hidróxido de cobre	AT
HV 38	Três Pontas-MG	epoxiconazol + flutriafol	AT
HV 41	Coqueiral-MG	triadimenol	AT
HV 42	Coqueiral-MG	triadimenol	AT
HV 43	Coqueiral-MG	triadimenol	AT
HV 44	Coimbra-MG	sem informação	AT
HV 48	Três Pontas-MG	epoxiconazol + ciproconazol	AT
HV 49	Santana da Vargem-MG	triadimenol	AT
HV 52	São Gotardo-MG	azoxistrobina + tebuconazol	AT
HV 53	São Gotardo-MG	azoxistrobina	AT
HV 55	Rio Paranaíba-MG	sem informação	A
HV 56	Rio Paranaíba-MG	sem informação	AT
HV 57	Rio Paranaíba-MG	epoxiconazol	AT
HV 58	Rio Paranaíba-MG	azoxistrobina + epoxiconazol	AT
HV 59	Rio Paranaíba-MG	azoxistrobina + epoxiconazol	A
HV 62	Arapuá-MG	epoxiconazol	A
HV 63	Arapuá-MG	epoxiconazol	AT
HV 64	Carmo do Paranaíba-MG	epoxiconazol	AT
HV 65	Carmo do Paranaíba-MG	sem informação	AT
HV 66	Carmo do Paranaíba-MG	sem informação	AT
HV 68	Carmo do Paranaíba-MG	ciproconazol	A
HV 69	Lagoa Formosa-MG	ciproconazol	AT
HV 70	Lagoa Formosa-MG	ciproconazol	AT
HV 72	Patos de Minas-MG	ciproconazol	AT
HV 73	Patos de Minas-MG	ciproconazol	AT
HV 74	Patos de Minas-MG	ciproconazol	AT
HV 75	Coromandel-MG	sem informação	AT

HV 76	Coromandel-MG	sem informação	AT
HV 78	Patrocínio-MG	ciproconazol	A
HV 80	Patrocínio-MG	azoxistrobina/ciproconazol	AT
HV 82	Serra do Salitre-MG	sem informação	A
HV 83	Ibiá-MG	sem aplicação	A
HV 84	Ibiá-MG	sem aplicação	AT
HV 85	Ibiá-MG	epoxiconazol	AT
HV 86	Ibiá-MG	azoxistrobina/ciproconazol	AT
HV 87	Ibiá-MG	ciproconazol	AT
HV 88	Campos Altos-MG	sem aplicação	AT
HV 89	Campos Altos-MG	sem aplicação	T
HV 90	Santana da Vargem-MG	epoxiconazol + azoxistrobina/ciproconazol	AT
HV 93	Ervália-MG	flutriafol	A
HV 94	Ervália-MG	flutriafol	AT
HV 96	Ervália-MG	sem aplicação	A
HV 99	São Miguel do Anta-MG	sem informação	A
HV 100	São Miguel do Anta-MG	sem informação	A
HV 120	Jaguaré-ES	sem informação	A
HV 121	Jaguaré-ES	sem informação	A
HV 122	Jaguaré-ES	sem informação	AT
HV 123	Jaguaré-ES	sem informação	A
HV 124	Jaguaré-ES	sem informação	A

*A: isolados utilizados no teste de sensibilidade a azoxistrobina.

*T: isolados utilizados no teste de sensibilidade a tebuconazol.

*AT: isolados testados quanto a azoxistrobina e tebuconazol, respectivamente.



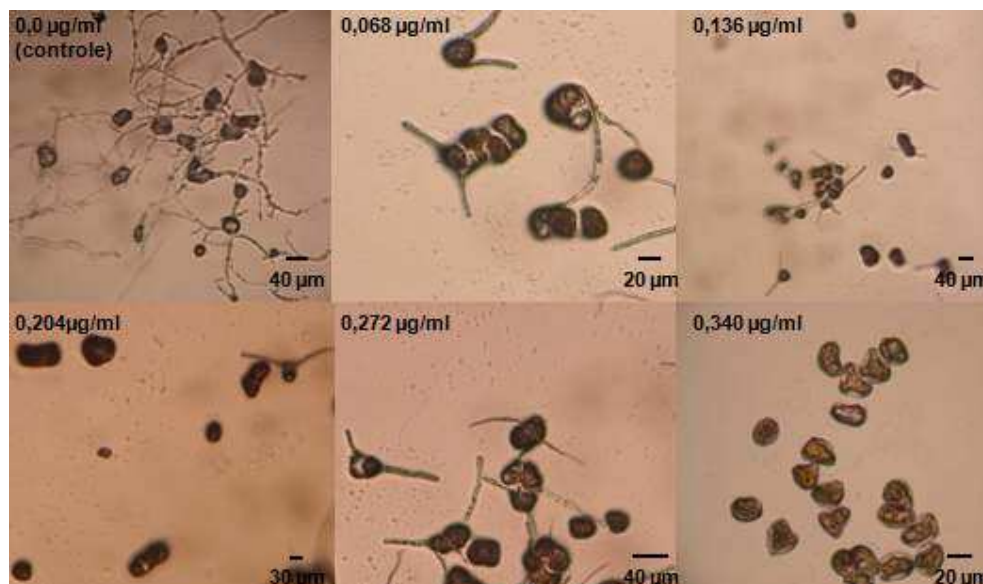
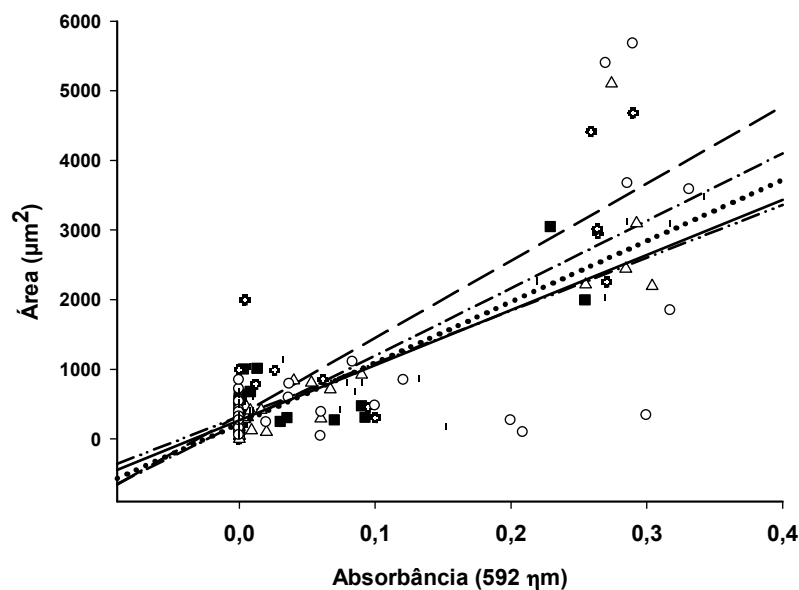


Figura 3. Germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* em diferentes concentrações de azoxistrobina.

3.2. Sensibilidade de isolados de *H. vastatrix* a tebuconazol

Houve correlação positiva, acima de 69%, entre a área do tubo germinativo e a absorbância (Figura 4). Alguns valores de absorbância nas maiores concentrações de fungicida ficaram negativos quando se subtraiu o valor do respectivo tratamento controle (“branco”) a cada repetição. Esses valores foram considerados como erros de leitura e atribuiu-se o valor 0. Todos os isolados foram sensíveis ao tebuconazol.

Apesar de haver formação de tubos germinativos, sua espessura e morfologia foram alteradas (Figura 5). Houve redução da espessura e da elongação. Observaram-se deformações nos tubos germinativos nas concentrações acima de 0,1 µg/ml de tebuconazol.



—■— Hv 1 = 323,5 + 7591,2x; R ² = 0,64	◆···· Hv 48 = 219 + 8747,3x; R ² = 0,48
—●— Hv 4 = 341,8 + 11087,4x; R ² = 0,78	—×— Hv 53 = 265,8 + 7916,6x; R ² = 0,81
—△— Hv 41 = 225,7 + 9684x; R ² = 0,79	

Figura 4. Relação de valores de absorvância e área do tubo germinativo de cinco isolados de *Hemileia vastatrix* sob diferentes concentrações de tebuconazol (0; 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 µg/ml). R² = coeficiente de determinação.

Os valores de DE₅₀ obtidos a partir da absorvância variaram de 0,01 a 5,11 µg/ml (Figura 2b). Sem considerar a procedência, a classe 0,011 – 0,1 µg/ml foi a de maior frequência, com 32 isolados (64% do total). Nas classes de 0,01 a 1 µg/ml e 1,1 – 6 µg/ml, as frequências foram 11 isolados (22%) e 7 isolados (14%), respectivamente. Não houve diferença significativa entre as classes de DE₅₀ e a procedência dos isolados ($\chi^2 = 3,23$; $P=0,20$), nem entre as lavouras com histórico de aplicação de fungicidas (triazóis ou não) ou sem histórico de uso de fungicida ($\chi^2 = 0,24$; $P=0,89$). Não houve correlação entre distância geográfica e a DE₅₀ média ($r = 0,01$; $P=0,35$).

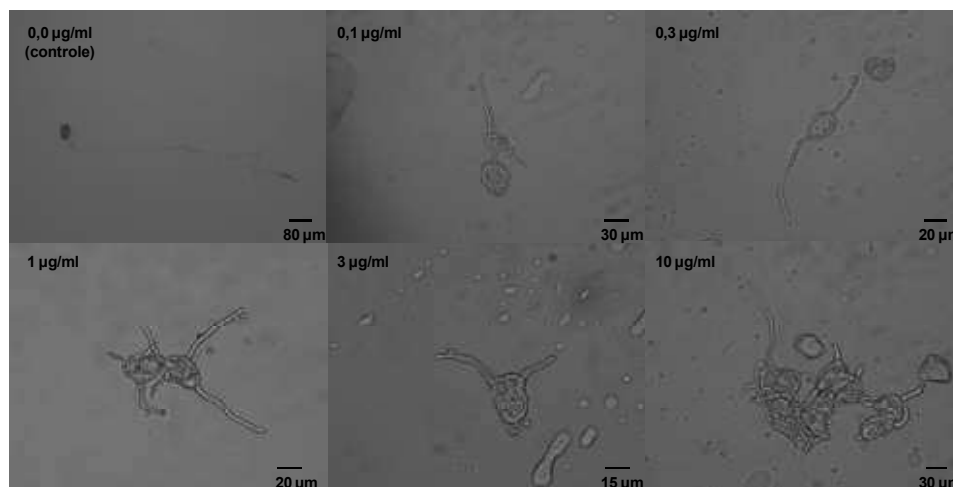


Figura 5. Variabilidade na morfologia do tubo germinativo de *Hemileia vastatrix* em diferentes concentrações de tebuconazol.

3.3. Amplificação parcial e sequenciamento dos genes *CYTB* e *CYP51*

Todas as combinações de *primers* testadas para o gene *CYTB* amplificaram fragmentos com tamanhos esperados. As melhores temperaturas de anelamento foram 56,4°C para a combinação HvCYTB-f5/HvCYTB-r4; 52°C para HvCYTB-f3/HvCYTB-r1 e HvCYTB-f4/HvCYTB-r1; e 50°C para HvCYTB-f3/HvCYTB-r2.

Para amplificação parcial do gene *CYP51*, três combinações de *primers* foram testadas, duas combinações de *primers* degenerados, HvdCYP51f/HvdCYP51-r1 e HvdCYP51-r2, e os *primers* KES-845-F/KES-837-R (Stammler et al., 2009). Nenhuma das combinações testadas amplificou fragmentos (Figura 6b).

Obteve-se *amplicon* de 688 com a combinação de *primers* HvCYTB-f3/HvCYTB-r2 e de 705 nucleotídeos com a combinação HvCYTB-f5/HvCYTB-r4. Após o alinhamento local (BLAST), verificou-se que o primeiro *amplicon* apresentou identidade de 97% e o segundo de 100%, ambos com *e-value* = 0,0, com a única sequência do gene *CYTB* de *H. vastatrix* depositada no GenBank.

Após alinhamento das sequências, observou-se que os *primers* HvCYTB-f5/HvCYTB-r4 amplificaram fragmento entre a metade do segundo éxon e a metade do segundo íntron, onde foi possível detectar o códon para fenilalanina na posição 129 (Figura 7). Os *primers* HvCYTB-f3/HvCYTB-r2 amplificaram um fragmento entre o terço final do segundo íntron e a metade do terceiro íntron, englobando a sequência completa do terceiro éxon, região do códon para glicina na posição 143 do gene *CYTB* (Figura 7). As mutações F129L e G143A não foram detectadas nos isolados testados para azoxistrobina.

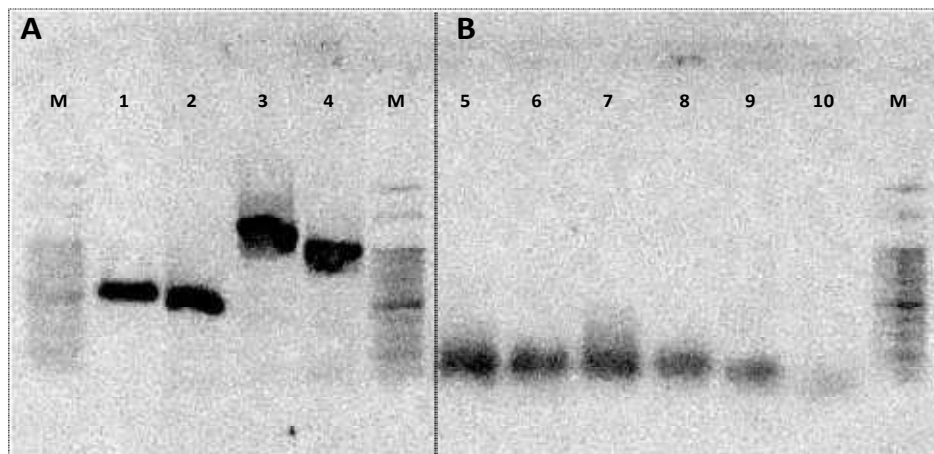


Figura 6. Amplificações parciais dos genes *CYTB* e *CYP51* de *Hemileia vastatrix*. No painel A, as combinações de *primers* foram 1: HvCYTBf5/HvCYTB-r4; 2: HvCYTBf3/HvCYTB-r1; 3: HvCYTBf4/HvCYTB-r1; e 4: HvCYTBf3/HvCYTB-r2. No painel B, as canaletas de 5 a 10 incluem as combinações de *primers* testadas para o gene *CYP51* com dois isolados de *H. vastatrix*. As bandas apresentadas são produtos de amplificação inespecífica. 5 e 6: HvdCYP51-f/ HvdCYP51-r1; 7 e 8: HvdCYP51-f/ HvdCYP51-r2; e 9 e 10: KES-845-F/KES-837-R. M) Marcador de 100 pb.

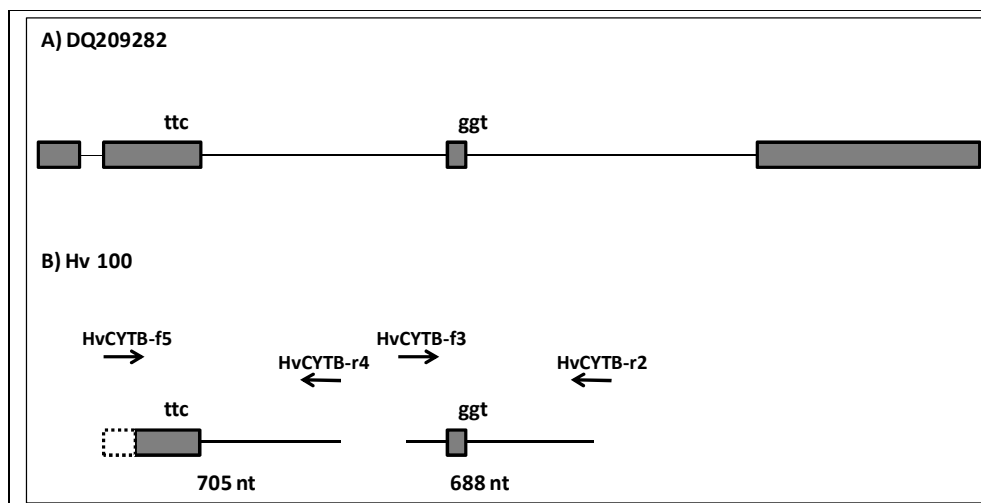


Figura 7. Representação esquemática do gene *CYTB* de *Hemileia vastatrix* evidenciando os éxons e íntrons. A) Estrutura do gene *CYTB* de *H. vastatrix* (GenBank DQ209282). B) Sequências amplificadas do gene *CYTB* do isolado Hv 100 com os *primers* desenhados neste trabalho. Caixas em cinza representam éxons e as linhas os íntrons; ttc representa o códon para o aminoácido fenilalanina na posição 129 do gene; ggt representa o códon para a glicina no final do éxon, posição 143. As setas indicam regiões flanqueadas pelos *primers*.

4. Discussão

Não há evidências de perda de sensibilidade de *H. vastatrix* ao fungicida azoxistrobina. Apesar de serem sensíveis a tebuconazol, os isolados apresentaram distribuição entre as classes de DE₅₀ (Figura 2B) semelhante a resposta de perda de sensibilidade qualitativa (Brent & Hollomon, 2007). Não foram encontrados isolados insensíveis a azoxistrobina nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, como também não houve associação entre DE₅₀ e procedência dos isolados. Apesar do modo de ação sítio-específico e do uso intensivo de fungicidas do grupo IQE em lavouras nestas regiões, até o momento, a população amostrada é sensível.

Fungos causadores de ferrugens são considerados como de médio risco de surgimento de resistência a IQE (Brent & Hollomon, 2007a). A presença de um íntron tipo I logo após o códon para glicina na posição 143 do *CYTB* dificultaria a

manutenção de mutantes na população (Grasso et al., 2006). Segundo essa hipótese, a mutação G143A, por exemplo, poderia impedir o *splicing*, pois os dois últimos nucleotídeos do códon para glicina (GT) são essenciais para o reconhecimento e remoção do íntron. A substituição na posição 143 afetaria esse processo e, conseqüentemente, causaria erros na tradução do gene *CYTB*, que seria letal para o microrganismo (Grasso et al., 2006). Relatos de resistência a estrobilurina indicam que, em geral, as mutações G143A e/ou F129L são consistentes entre diferentes classes de fungos (Fernández-Ortuño et al., 2008b). No entanto, essas mutações não parecem ser as únicas a conferir resistência ao fungicida, pois isolados insensíveis de *Podosphaera fusca* e *Venturia inaequalis* não tinham as mutações típicas (Fernández-Ortuño et al., 2008a; Steinfeld et al., 2001). Em basidiomycotas, como *Strobilurus tenacellus*, *Mycena galopoda* e *M. viridimarginata*, além das mutações típicas, outras como G153S, N261D e T127I são capazes de reduzir a sensibilidade a β -metoxiacrilatos (Kraiczky et al., 1996). Existe apenas um relato sobre a possível resistência de fungo causador de ferrugem, *Puccinia horiana*, a estrobilurina, mas não foi esclarecido o mecanismo que pode atuar na mudança da sensibilidade (Cook, 2001).

Mutantes naturais podem ocorrer na população em uma frequência de um esporo em um bilhão, porém a resistência é normalmente detectável apenas quando esta frequência aumenta para um esporo em 100 ou 10 milhões (Brent & Hollomon, 2007b). Além disso, algumas mutações apesar de causar resistência, podem gerar um custo adaptativo e, conseqüentemente, serem instáveis na população (Avila-Adame & Köller, 2003). Apesar de os fungicidas ainda estarem controlando eficientemente a ferrugem em Minas Gerais e Espírito Santo, a presença de mutantes no campo não pode ser totalmente descartada.

Outros fatores além das mutações devem ser considerados na avaliação de risco de resistência a IQE: mecanismo de reparo menos eficiente no DNA mitocondrial que no nuclear em vista do menor número de proteínas envolvidas (Larsen et al., 2005); produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio durante a fosforilação oxidativa, que pode contribuir para o aumento de mutações (Yakes & VanHouten, 1997) e a herança do mtDNA, geralmente uniparental, mas que em basidiomicetos e alguns ascomicetos pode ser distinta pelo fato de haver células heteroplásmicas (Gisi et al., 2002). Considerando as características populacionais, a evolução da resistência a IQE é afetada pela variabilidade genética, a qual foi demonstrada ser alta nas populações brasileiras de *H. vastatrix* (Maia, 2009; Nunes et al., 2009; Várzea & Marques, 2005; Zambolim et al., 2005). Do ponto de vista genético-evolutivo, quatro fatores relativos a *H. vastatrix* podem afetar o risco de surgimento de mutantes na população: tamanho da população, recombinação, migração e seleção imposta pelo uso inadequado de fungicidas (Gisi et al., 2002). O patógeno tem alta taxa de multiplicação e grande quantidade de esporos é produzida durante a epidemia (Kushalappa & Eskes, 1989a), o que contribui para aumentar as chances de ocorrerem indivíduos mutantes. Há fortes indícios de ocorrência de recombinação em *H. vastatrix* no Brasil (Fernandes et al., 2009) e a combinação de mutantes em diferentes *backgrounds* genéticos pode resultar em indivíduos com maior valor adaptativo e passíveis de permanecerem na população. O transporte de esporos pode ocorrer facilmente a longas distâncias (Bawden et al., 1971). O uso de fungicidas sistêmicos em várias regiões é parte integrante do manejo adotado nas lavouras cafeeiras. Porém, o uso racional desses produtos, com poucas aplicações, talvez seja o principal fator limitante à ocorrência de isolados resistentes.

Os fungicidas reduziram tanto a espessura quanto o comprimento do tubo germinativo. Todos os processos catabólicos e anabólicos, assim como transferência de informação genética e gradiente osmótico de uma célula necessitam de energia na forma de ATP (Lehninger et al., 2005). Os IQE's bloqueiam a transferência de elétrons do complexo III e, conseqüentemente, causam deficiência energética. Na maioria dos fungos, a germinação é processo estritamente aeróbico e dependente da respiração (Allen, 1965). Em *Botryodiplodia theobromae*, a adição de antimicina A, inibidor da rota fosforilativa, reduziu a germinação. Além disso, o incremento da respiração durante a germinação dependeu da síntese das subunidades protéicas da ATPase (enzima que catalisa a hidrólise de ATP) (Wenzler & Brambl, 1981). A redução da germinação e alongação do tubo germinativo observadas nos isolados de *H. vastatrix* como consequência da inibição da respiração, provavelmente afetaria o início da infecção no campo, pois a diferenciação do tubo germinativo em apressório e invasão do tecido da planta estariam comprometidas (Coutinho et al., 1993; Griffin, 1994, Niks, 1990).

Observou-se redução na germinação dos urediniósporos dos isolados submetidos a diferentes concentrações de tebuconazol. Este fungicida também afetou a alongação do tubo germinativo. Na maioria dos casos, fungicidas triazóis não interferem na germinação dos esporos (Buck & Williams-Woodward, 2003; Pontzen & Scheinpflug, 1989). No entanto, pode haver diferença entre espécies no início da biossíntese de esterol e, conseqüentemente, respostas diferenciadas ao fungicida (Clarkson et al., 1997; Pontzen & Scheinpflug, 1989). Deformações em tubos germinativos de urediniósporos de *Puccinia graminis* submetidos a diferentes concentrações de propiconazol, outro fungicida IDM, foram observadas. Doses crescentes do fungicida reduziram a germinação e o comprimento do tubo

germinativo, sendo que a 10 µg/ml houve redução da elongação em 75% devido a alterações na permeabilidade da membrana e desorganização das organelas no ápice do tubo germinativo (Dahmen et al., 1988). A redução da elongação e deformações do tubo germinativo de *H. vastatrix*, como consequência da inibição da síntese de ergosterol, provavelmente, são decorrentes de alterações na membrana plasmática, o que pode acarretar perda de potássio e acúmulo de metabólitos secundários (Griffin, 1994).

O conhecimento sobre a sensibilidade de *H. vastatrix* a triazóis e estrobilurinas é escasso e não há protocolos estabelecidos pelo FRAC para monitorar a sensibilidade deste fungo aos fungicidas. Tampouco há um padrão estabelecido para comparação em testes de sensibilidade, a denominada “baseline”. A comparação entre DE₅₀ de espécies distintas de fungos causadores de ferrugens não é procedimento adequado, pois pode haver diferenças de sensibilidade entre espécies. Há também variações quanto à sensibilidade de uma espécie a diferentes fungicidas de um mesmo grupo: a germinação e perda de eletrólitos de *Puccinia recondita* (ferrugem da folha do trigo) foram afetadas diferencialmente por fungicidas triazóis. A DE₅₀ para o procloraz foi 88 µg/ml e observaram-se mudanças na condutividade da solução do urediniósporo durante o processo de germinação. Para os fungicidas fluzilazol e fenarimol, as DE₅₀ foram 3,5 e 6,9 µg/ml, respectivamente, e os produtos foram considerados eficientes com base nos valores de severidade e alterações na permeabilidade da membrana (Kim et al., 2003a). Adicionalmente, devem se estabelecer procedimentos para que resultados obtidos *in vitro* sejam correlacionados à sensibilidade em campo. No entanto, nem sempre esta correlação ocorre. Isolados de *Puccinia triticina* com valores DE₅₀ de 1,64 µg/ml tiveram a mutação Y134F e superexpressão do *CYP51*. Porém, a frequência de mutantes foi baixa e não se

correlacionou com os resultados obtidos de eficiência de controle do fungicida epoxiconazol (Stammler et al., 2009). Neste sentido, a determinação da resistência prática de campo é fundamental para estabelecer as classes de DE₅₀ de fungicidas a serem adotadas nos trabalhos de avaliação de sensibilidade.

Nas sequências amplificadas do gene *CYTB* dos isolados testados para azoxistrobina não ocorreram as mutações típicas para resistência a estrobilurinas. Portanto, esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos *in vitro*. Contudo, os *primers* desenhados poderão ser úteis em futuras avaliações da sensibilidade de *H. vastatrix* a estrobilurinas, principalmente para a implementação de quantificação de frequência de mutantes insensíveis por meio da PCR em tempo real.

O monitoramento da sensibilidade de patógenos a fungicidas é essencial para compreender a distribuição, evolução e impacto da resistência no campo (Brent & Hollomon, 2007a). Além disso, torna-se muito importante para avaliar a eficiência e durabilidade dos fungicidas, assim como na tomada de decisão dos fitopatologistas, extensionistas e empresas químicas. Com o monitoramento sistemático, pode-se detectar pequenas mudanças na sensibilidade a fungicidas nas populações. A detecção tardia da insensibilidade de *H. vastatrix* a fungicidas possivelmente causaria maiores dificuldades no manejo da doença, pois a esporulação e a dispersão de esporos do patógeno são eficientes. Os produtores devem manter o uso racional de fungicidas sistêmicos e adotar medidas que contribua para aumentar a eficiência de controle da ferrugem. Neste sentido, a utilização de fungicidas com diferentes modos de ação, alternância de produtos, restrição do número de aplicações, utilização da dose adequada do produto como também a adoção do manejo integrado, estratégias preconizadas pelo FRAC (Brent & Hollomon, 2007a), garantem o controle eficiente no campo e dificultam o surgimento de resistência a fungicidas.

5. Conclusões

- Populações de *H. vastatrix* dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo são sensíveis aos fungicidas azoxistrobina e tebuconazol.
- Os desenvolveram-se *primers* para detecção das mutações no gene *CYTB*, os quais serão úteis para futuros trabalhos de monitoramento genético da sensibilidade.

6. Referências bibliográficas

- AGROFIT. (2010) Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em 20 de Dezembro de 2009.
- Allen PJ. (1965) Metabolic aspects of spore germination in fungi. *Annu Rev Phytopathol* **3**:313-342.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Mersy EW, Lipman DL. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
- Avelino J, Willocquet L, Savary S. (2004) Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. *Plant Pathol* **53**:541-547.
- Avila-Adame C and Koller W. (2003) Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Curr Genet* **42**:332-338.
- Bawden J, Gregory PH, Johnson CG. (1971) Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature* **229**:500.
- Brent KJ and Hollomon DW. (2007a) *Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?* Brussels, Belgium, Fungicide Resistance Action Committee.
- Brent KJ and Hollomon DW. (2007b) *Fungicide resistance: The assessment of risk.* Brussels, Belgium, Fungicide Resistance Action Committee.
- Buck JW, and Williams-Woodward JL. (2003) The effect of fungicides on urediniospore germination and disease development of daylily rust. *Crop Prot* **22**:135-140.

- Buzzerio NF. (2006) *Phakopsora pachyrhizi* in vitro method Syngenta. Disponível em: http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/. Acessado em: 25 de Março de 2009.
- Capucho AS, Souza AF, Zambolim EM, Caixeta ET, Rufino RJN, Barbosa JC, Alvarenga SM, Zambolim L. (2005) Viabilidade de uredósporos da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) sob diferentes métodos de preservação in vitro. In: *Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil*. Londrina, Brasil, Embrapa - Café.
- Clarkson JP, Kennedy R, Phelps K, Davies J, and Bowtell J. (1997) Quantifying the effect of reduced doses of propiconazole (Tilt) and initial disease incidence on leek rust development. *Plant Pathol* **46**:952-963.
- Cook RTA. (2001) First report in England of changes in the susceptibility of *Puccinia horiana*, the cause of chrysanthemum white rust, to triazole and strobilurin fungicides. *Plant Pathol* **50**:792.
- Coutinho TA, Rijkenberg FHJ, Van Asch MAJ. (1993) Appressorium formation by *Hemileia vastatrix*. *Mycol Res* **97**:951-956.
- Cunha RL, Mendes ANG, Chalfoun SM. (2004) Controle químico da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. *Ciênc Agrot* **28**:990-996.
- Dahmen H, Hoch HC, Staub T. (1988) Differential effects of sterol inhibitors on growth, cell-membrane permeability, and ultrastructure of two target fungi. *Phytopathology* **78**:1033-1042.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**:19-21.

- Délye C, Laigret F, Corio-Costet MF. (1997) A mutation in the 14 alpha-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *App Env Microbiol* **63**:2966-2970.
- Fernandes RD, Evans HC, Barreto RW. (2009) Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Trop Plant Pathol* **34**:108-113.
- Fernández-Ortuño D, Perez-Garcia A, Lopez-Ruiz F, Romero D, de Vicente A. Tores JA. (2006) Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. *Eur J Plant Pathol*, **115**:215-222.
- Fernández_Ortuño D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A. (2008a) Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Pest Manag Sci* **64**:694-702.
- Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García, A. (2008b) Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Inter Microbiol* **11**:1-9.
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A. (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag Sci* **58**:859-867.
- Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A, Gisi U. (2006) Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag Sci* **62**:465-472.
- Griffin DH. (1994) *Fungal physiology*. New York, United States, Willey-Liss.
- Guzzo SD, Harakava R, Tsai SM. (2009) Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. *J Phytopathol* **157**:625-638.

- Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, Lee YJ, Makizumi Y, Akutsu K, Hibi T. (2000) Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 alpha-demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *App Env Microbiol* **66**:3421-3426.
- Hayashi K, Schoonbeek HJ, de Waard MA. (2002) Expression of the ABC transporter BcatrD from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pest Biochem Physiol* **73**:110-121.
- Hubert JJ. (1992) *Bioassay*. Dubuque, IA, Kendall/Hunt Publishing Company.
- Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Noguchi K, Nishimura K, Takeda T, Amano T. Hollomon DW. (2001) Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* **91**:1166-1171.
- Kim HT, Jang KS, Choi GJC, Lee SW, Cho KY. (2003a) Effect of prochloraz on electrolytic leakage and spore germination of *Puccinia recondita* causing wheat leaf rust. *Plant Pathol J* **19**:189-194.
- Kim YS, Dixon EW, Vincelli P, Farman ML. (2003b) Field resistance to strobilurin (Q(o)I) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* **93**:891-900.
- Köller W. (1999) Chemical approaches to managing plant pathogens. In: Ruberson JR (ed) *Handbook of Pest Management*. New York, United States, Marcel Dekker Inc.
- Kraiczky P, Haase U, Gencic S, Flindt S, Anke T, Brandt U, VonJagow G. (1996) The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome bc(1) complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Q(P) inhibitors. *Eur J Biochem* **235**:54-63.

- Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K. (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* **9**:299-306.
- Kushalappa AC and Eskes AB. (1989a) Advances in coffee research. *Annu Rev Phytopathol* **27**:503-531.
- Kushalappa AC and Eskes AB. (1989b) *Coffee rust: Epidemiology, resistance and management*. Florida, United States, CRC Press.
- Larsen NB, Rasmussen M, Rasmussen LJ. (2005) Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion* **5**:89-108.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. (2005) *Principles of biochemistry*. New York, United States, Worth Publishers.
- Maia TA. (2009) Análise da estrutura genética da população de *Hemileia vastatrix* com base no marcador AFLP. Viçosa. Brasil, Universidade Federal de Viçosa, M.Sc.
- NCBI. (2010) ORF Finder (Open reading frame finder). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>. Acessado em: 02 de Fevereiro de 2010.
- Niks RE. (1990) Effect of germ tube length on the fate of sporelings of *Puccinia hordei* in susceptible and resistant barley. *Phytopathology* **80**:57-60.
- Nunes CC, Maffia LA, Mizubuti ESG, Brommonschenkel SH, Silva JC. (2009) Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. *Austral Plant Pathol* **38**:445-452.
- Olaya G and Köller W. (1999) Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Dis* **83**:274-278.

- Pontzen R and Scheinpflug H. (1989) Effects of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici*. *Eur J Plant Pathol* **95**:151-160.
- Rose TM Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum, C. M. & Henikoff, S. (1998) Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly-related sequences. *Nucleic Acids Res* **26**:1628-1635.
- Rozen S and Skaletsky HJ. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. & Misener, S. (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, United States, Humana Press, pp 365-386.
- Staden R. (1996) The staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* **5**:233-241.
- Stammler G. (2009) *Septoria tritici* microtiter monitoring method BASF. Disponível em: http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/. Acessado em 06 de Junho de 2009.
- Stammler G, Cordero J, Koch A, Semar M and Schlehuber S. (2009) Role of the Y134F mutation in *CYP51* and overexpression of *CYP51* in the sensitivity response of *Puccinia triticina* to epoxiconazole. *Crop Prot* **28**:891-897.
- Steinfeld U, Sierotzki H, Parisi S, Poirey S, Gisi U. (2001) Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Manag Sci* **57**:787-796.
- Stergiopoulos I, Van Nistelrooy JGM, Kema GHJ, de Waard MA. (2003) Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* **59**:1333-1343.

- R Development Core Team. (2009) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, Vienna. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, R Foundation for Statistical Computing.
- Van der Vossen HAM. (2005) State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea VMP (eds) *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa/DFP, pp 450.
- Várzea VMP and Marques DV. (2005) Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea VMP (eds) *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, Departamento de Fitopatologia/UFV, pp 53-74.
- Wenzler H, Brambl R. (1981) Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination - catalytic activity, composition, and subunit biosynthesis of oligomycin-sensitive ATPase in *Botryodiplodia*. *J Biol Chem* **256**:7166-7172.
- Yakes FM and Van Houten B. (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **94**:514-519.
- Zambolim L, Vale FXR, Costa H, Pereira AA, Chaves GM. (2002) Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. In: Zambolim L (ed) *O estado da arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa, Departamento de Fitopatologia/UFV, pp 369-450.
- Zambolim L, Vale FXR, Pereira AA, Chaves GM. (1997) *Café (Coffea arabica L.)*. In: Vale FXR and Zambolim L (eds) *Controle de doenças de plantas*. Brasília, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, pp 83-179.

Zambolim L, Zambolim EM, Caixeta ET, Jesus Junior WC. (2007) Características rastreáveis do manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: Zambolim L (ed) *Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café*. Viçosa, Departamento de Fitopatologia/UFV, pp 85-128.

Zambolim L, Zambolim EM, Vale FXR, Pereira AA, Sakyama NS, Caixeta AT. (2005) Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br in Brasil – Physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim, L., Zambolim, E. M. & Várzea, V. M. P. (eds) *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, Departamento de Fitopatologia/UFV, pp 75-98.