

Método eficiente, baseado em leitores de microplaca, para detecção de resistência a fungicidas triazóis (IDM) e estrobirulinas (IQe) em populações do patógeno da brusone do trigo

Priscila Santos Casado^{1,2}, Giselle de Carvalho^{1,3}, Paulo Cezar Ceresini¹, Vanina Lilian Castroagudín^{1,4}, Omar Jorge Sabbag^{1,5}, Samara Nunes Campos Vicentini^{1,6}, João Leodato Nunes Maciel⁷

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Ilha Solteira, CEP 15385-000, Ilha Solteira, SP, Brasil. Tel. +55 (18) 3743-1948. ²pscasado0@gmail.com. ³gisellecarvalho05@gmail.com. ⁴v.castroagudin@gmail.com. ⁵sabbag@agr.feis.unesp.br. ⁶samara.skcampos@gmail.com. ⁷Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Trigo, Passo Fundo, RS, Brasil. Tel. +55 (54) 3316-5800. joao.nunes-maciel@embrapa.br.

Autor para correspondência: Paulo Cezar Ceresini (paulo.ceresini@bio.feis.unesp.br)

Data de chegada: 11/09/2017. Aceito para publicação em: 04/11/2017.

10.1590/0100-5405/185072

RESUMO

Casado, P. S.; Carvalho, G.; Ceresini, P.C.; Castroagudín, V.L.; Sabbag, O.J.; Vicentini, S.N.C.; Maciel, J.L.N. Método eficiente, baseado em leitores de microplaca, para detecção de resistência a fungicidas triazóis (IDM) e estrobirulinas (IQe) em populações do patógeno da brusone do trigo. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.3, p.236-244, 2018.

Esta pesquisa propõe a utilização de um método baseado em leitor automatizado de microplacas para detectar resistência a fungicidas triazóis (IDM) e estrobirulinas (IQe) em populações do fungo hemibiotrófico fitopatogênico *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt) do trigo. A disponibilidade de método acurado, mais rápido e eficiente para a detecção da redução da sensibilidade a fungicidas contribuiria para facilitar a tomada de decisão sobre o manejo químico da brusone do trigo no país. Há informação sobre redução da sensibilidade de triazóis no controle da brusone do trigo e evidências da ocorrência generalizada de redução da sensibilidade à estrobirulinas em populações do patógeno no Brasil. O método de microplaca foi acurado

em discriminar a variação fenotípica na sensibilidade entre isolados do patógeno aos fungicidas IDM tebuconazol e epoxiconazol e ao fungicida IQe azoxistrobina. Economicamente, ambos os métodos representam alto custo, portanto, é necessário comparar a eficiência desses métodos. O método de microplacas foi mais eficiente no uso de recursos, com custo operacional total 33% inferior ao do método de placas de Petri. Em conjunto, os fatores acurácia, rapidez e eficiência no uso de recursos indicaram que o método de microplaca pode ser utilizado no monitoramento da resistência a fungicidas em populações do fungo da brusone do trigo no agroecossistema brasileiro.

Palavras-chave: EC₅₀; acurácia; rapidez; recursos; eficiência; custos.

ABSTRACT

Casado, P. S.; Carvalho, G.; Ceresini, P.C.; Castroagudín, V.L.; Sabbag, O.J.; Vicentini, S.N.C.; Maciel, J.L.N. Efficient method, based on microplate readers, to detect resistance to triazole (DMI) and strobilurin (QoI) fungicides in wheat blast pathogen populations. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.3, p.236-244, 2018.

This study proposes the application of a method based on an automated microplate reader to detect resistance to triazole (DMI) and strobilurin (QoI) fungicides in populations of the plant pathogenic hemibiotrophic fungus *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt) from wheat. Availability of an accurate, more rapid and efficient method to detect eventual reduction in sensitivity to fungicides could contribute to facilitate the decision making on chemical management of wheat blast in the country. There are reports of reduction in the sensitivity of triazoles to control wheat blast and evidence of widespread reduction in the sensitivity to strobilurins in populations of the pathogen in Brazil. The microplate method was accurate

in discriminating the phenotypic variation in sensitivity among isolates of the pathogen to the DMI fungicides tebuconazole and epoxiconazole and to the QoI fungicide azoxystrobin. Economically, both methods represent high cost, therefore, the efficiency of these methods should be compared. The microplate method was more efficient in the use of resources, with a total operating cost 33% inferior to that of the Petri dish method. Together, the factors accuracy, celerity and efficiency in the use of resources indicated that the microplate method can be used to monitor resistance to fungicides among populations of the wheat blast fungus in the Brazilian agroecosystem.

Keywords: EC₅₀; accuracy; celerity; resources; efficiency; costs.

Desde os anos 70, o número de casos de fungos fitopatogênicos resistentes a fungicidas vem aumentando consideravelmente na agricultura, tornando-se um fator limitante a prejudicar o manejo químico de doenças, uma vez que os fungicidas tornam-se ineficazes (11). Surpreendentemente, no Brasil as contribuições da pesquisa que quantificam a magnitude do impacto da resistência de fungicidas nos mais diversos patossistemas locais têm sido escassas, limitando-se a revisões de literatura ou a estudos pontuais (5; 9; 12; 13; 23). Talvez

por essa escassez de informação sobre o cenário atual da resistência a fungicidas na agricultura brasileira, não há relatos de qualquer iniciativa para implementação de um sistema local de monitoramento como estratégia para manejar a emergência da resistência e os impactos pós-emergência associados com a redução da eficácia dos fungicidas em culturas de importância agrícola (28).

Mesmo mundialmente, são escassos os exemplos de sistemas de monitoramento da resistência a fungicidas em populações

de fitopatógenos na agricultura que possibilitem aos produtores de determinada cultura a tomada de decisão, em tempo real, em substituir fungicidas na eventualidade da constatação de resistência a princípios ativos de alto risco. Como exceção à regra, no Reino Unido pesquisadores desenvolveram e implementaram o único sistema de detecção e monitoramento, em tempo real, da redução da sensibilidade a fungicidas em populações de fitopatógenos do trigo (18).

A viabilização da implementação de um sistema semelhante de monitoramento da resistência a fungicidas em fungos fitopatogênicos no país depende do desenvolvimento de métodos acurados, rápidos e eficientes de detecção (15). Há vários métodos convencionais utilizados para detecção e monitoramento da variação fenotípica na sensibilidade de fungos necrotróficos e hemi-biotróficos a fungicidas, visando evidenciar a ocorrência de redução da sensibilidade em populações de fitopatógenos. Esses métodos convencionais são baseados na análise relativa do crescimento micelial *in vitro* em meios de cultura suplementados com doses discriminatórias de fungicidas ou com doses seriadas para determinar a EC_{50} (concentração efetiva do fungicida capaz de inibir 50% do crescimento micelial) populacional (6; 7; 16). Entretanto, os métodos convencionais são, em sua maioria, muito demorados, pouco acurados devido à dependência de critérios visuais e manuais nas avaliações, e ineficientes no uso de recursos requerendo centenas a milhares de placas de Petri de meio de cultura (2). Além disso, esses métodos convencionais são potencialmente mais prejudiciais ao meio ambiente em função da geração de maior quantidade de material de descarte com resíduos tóxicos de fungicidas (1; 27).

Para acelerar o processo de detecção da redução da sensibilidade a fungicidas em populações de fitopatógenos propôs-se o uso do método de microplacas otimizado para esta finalidade específica (14). O método de microplacas é baseado na medida simples da biomassa fúngica ou da atividade cinético-microbiana em reposta ao efeito de diferentes doses de fungicidas (3; 4; 17; 19). O fungo é cultivado em meio de cultura líquido em um poço da microplaca e o crescimento ou a atividade cinética microbiana são medidos por meio da absorvância de luz que resulta da variação da turbidez ou da intensidade de fluorescência em decorrência do ataque enzimático a um substrato específico (3; 4; 17; 30). Como a avaliação da inibição do crescimento micelial na presença de fungicidas se baseia no uso de tecnologia de leitura automatizada da absorvância de luz em dezenas de amostras simultaneamente, esse método é potencialmente mais rápido, mais acurado e mais eficiente. Isso porque leitores de microplacas possuem sistemas operacionais que reduzem o tempo envolvido no tratamento de dados, uma vez que se baseiam em leitura de valores de absorvância e cálculos da reposta fenotípica de maneira automática (3; 17).

Como referencial para implementar o método de microplacas para detecção de resistência a fungicidas em um patossistema fúngico particular recomenda-se que: i) o volume total de suspensão dentro de cada poço da microplaca deve estar entre 75 e 200 μL , ii) a concentração inicial da suspensão de esporos deve estar no mínimo a 10^4 esporos mL^{-1} e iii) o comprimento de onda utilizado para a leitura da absorvância deve ser especificamente selecionado para cada fungo fitopatogênico e sistema específico de detecção (15; 18).

Se a otimização do método de microplacas para detecção e monitoramento da redução da sensibilidade a fungicidas em populações do fungo da brusone do trigo for bem-sucedida, poderá ser utilizada para nortear a tomada de decisão, em tempo real (i.e., durante a própria safra), sobre o manejo químico dessa doença foliar, mas principalmente de espigas.

No presente estudo, propôs-se o desenvolvimento do método de

microplaca para a medida do crescimento fúngico como mais rápido, acurado e eficiente para discriminar e quantificar a sensibilidade das populações do fungo fitopatogênico *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt), agente causal da brusone do trigo no Brasil, aos fungicidas triazóis [ou inibidores da desmetilação de esteróis (IDM)] tebuconazol e epoxiconazol e à estrobirulina [ou inibidores da quinona externa (IQe)] azoxistrobina. A brusone é considerada a principal doença do trigo no Brasil, e há indícios da ineficácia de triazóis (10; 25) e evidências da ocorrência generalizada de resistência a estrobilurinas em populações do patógeno no Brasil (5; 24).

Para atingir esse objetivo específico, foram efetuadas: i) análise da acurácia do método em discriminar os fenótipos de resistência e sensibilidade de populações de Pygt da brusone do trigo aos fungicidas IDM e IQe com base na EC_{50} ; ii) análise do rendimento relativo do método de microplacas em relação ao método de placas de Petri, considerando o número efetivo de amostras analisadas num tempo fixo (como medida de rapidez); e iii) análise econômica comparativa entre os métodos de microplaca e de placa de Petri, usando estimativas do custo operacional total como medida de eficiência no uso de recursos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados do patógeno utilizados nesse estudo foram obtidos de amostras populacionais de *P. graminis-tritici* da brusone do trigo e de *P. oryzae* (Po) do arroz provenientes de Mato Grosso do Sul (MS) e Goiás (GO) no centro-sul do Brasil nos anos de 2007, 2012 e 2013, os quais se encontram preservados na micoteca da UNESP Campus de Ilha Solteira (Tabela 1). No total foram utilizados treze isolados de Pygt, além de quatro isolados de Po do arroz obtidos do Tocantins (TO). Os isolados de Po foram incluídos no estudo pois representam o único grupo de isolados com padrão de sensibilidade a fungicidas triazóis IDM disponíveis (25). Todos esses isolados representam diferentes genótipos *multiloci* microssatélites (5; 21) e haplotipos com mutações distintas nos genes *cyp51A* (*cyp51A* H1 ou *cyp51A* H6) ou *cytB* (*cytB* H1 ou *cytB* H9) que conferem fenótipo de sensibilidade ou resistência aos fungicidas IDM ou IQe, respectivamente (5; 24; 25).

A acurácia do método de microplacas em discriminar os fenótipos de resistência e sensibilidade *in vitro* aos fungicidas IDM tebuconazol e epoxiconazol e ao IQe azoxistrobina, foi determinada comparando-se o fenótipo obtido para cada isolado analisado com aquele obtido anteriormente no método de placas de Petri (Tabela 1).

Para implementação do método de microplacas, utilizou-se equipamento do tipo leitor de microplaca (MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo ScientificTM, EUA) de forma semelhante ao descrito por Fraaije *et al.* (14) para medida do crescimento, porém com modificações. Para comparação entre métodos, utilizou-se os dados fenotípicos qualitativos (Tabela 1) e quantitativos obtidos por Oliveira *et al.* (24) e Poloni *et al.* (25) que empregaram o método de placas de Petri na fenotipagem da resistência/sensibilidade dos mesmos isolados de Pygt da brusone do trigo aos fungicidas IQe e IDM, respectivamente.

Os isolados de Pygt foram reativados em meio BDA (20,7 g L^{-1} de batata dextrose, 15 g L^{-1} ágar) e os isolados de Po foram reativados em meio de aveia (60 g L^{-1} de aveia, 15 g L^{-1} ágar), ambos com adição de cloranfenicol e estreptomina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada). Após sete dias da reativação das culturas, transferiu-se discos de micélio para placas contendo meio BDA e incubou-se por quinze dias a 24°C e 12 h de fotoperíodo. Para a coleta dos esporos foi realizada a raspagem superficial do micélio com o auxílio de uma espátula esterilizada na

Tabela 1. Descrição dos isolados de *Pyricularia graminis-tritici* e de *P. oryzae* selecionados para analisar a acurácia do método de microplacas na discriminação dos fenótipos de resistência e sensibilidade a fungicidas triazóis (IDM) e estrobirulinas (IQe)

Espécie e isolados	Local de origem e safra de coleta	Haplótipo do gene <i>cyp51A</i> e fenótipo para fungicidas triazóis (IDM) ^a			Haplótipo do gene <i>cytB</i> e fenótipo para fungicidas estrobirulinas (IQe) ^b			
		Haplótipo	NCBI	Fenótipo	Haplótipo	NCBI	Fenótipo	
<i>Pyricularia graminis-tritici</i> de trigo								
12.1.129	Amambaí e Aral Moreira, MS, 2012/2013	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível	
12.1.132		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível	
12.1.130		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível	
12.1.150		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível	
12.1.237		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível	
12.1.239		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível	
12.1.240		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível	
12.1.280		<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H9	KM023783	Sensível	
12.1.127		Rio Verde, GO, 2012/2013	<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente
12.1.146			<i>cyp51A</i> H1	KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente
12.1.028	<i>cyp51A</i> H1		KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente	
12.1.030	<i>cyp51A</i> H1		KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente	
12.1.068	<i>cyp51A</i> H1		KX620438	Resistente	<i>cytB</i> H1	KM023775	Resistente	
<i>Pyricularia oryzae</i> ^c								
630	TO, 2007	<i>cyp51A</i> H6	KX620437	Sensível	ND ^d	-	ND	
364		<i>cyp51A</i> H6	KX620437	Sensível				
704		<i>cyp51A</i> H6	KX620437	Sensível				
656		<i>cyp51A</i> H6	KX620437	Sensível				

^aCaracterizados por Poloni *et al.* (25); ^bCaracterizados por Castroagudín *et al.* (5) e Oliveira *et al.* (24). ^cIsolados de *P. oryzae* (*Po*) foram incluídos como controle pois não se detectou sensibilidade a fungicidas triazóis nas populações de isolados de *P. graminis-tritici*. ^dND Não determinado para este estudo uma vez que se detectou isolados de *Pygt* sensíveis para azoxistrobina. Entretanto, conhece-se que os isolados carregam o alelo *cytB* H9 e são sensíveis à azoxistrobina (5).

presença de água destilada esterilizada acrescida do espalhante adesivo Tween 80 (2 gotas L⁻¹). A concentração da suspensão de esporos foi determinada em câmara de Neubauer, ajustando-se para 2x10⁴ esporos mL⁻¹.

O experimento consistiu na análise de treze isolados de *Pygt* e quatro isolados de *Po*. Para o grupo de fungicidas IDM tebuconazol e epoxiconazol, foram utilizados os seguintes tratamentos: 13 isolados de trigo, quatro isolados de arroz, sete a nove doses dos fungicidas (Tabela 2), totalizando 127 parcelas experimentais cada. Para o fungicida IQe

azoxistrobina foram utilizados os seguintes tratamentos: 13 isolados de trigo e 12 doses do fungicida (Tabela 2), totalizando 156 parcelas experimentais. O volume total dispensado em cada poço da placa foi de 130 µL, distribuídos como segue: controle positivo (120 µL de caldo BD sem adição dos fungicidas + 10 µL da suspensão de esporos), branco ou controle negativo (130 µL de caldo BD com adição das distintas doses de fungicidas) e as demais amostras (120 µL de caldo BD com adição das doses de fungicidas + 10 µL da suspensão de esporos).

Para o experimento com fungicidas triazóis, a suspensão de

Tabela 2. Concentrações utilizadas dos fungicidas Folicur EC (tebuconazol a 200g L⁻¹, Bayer), Tango Cash (epoxiconazol a 75g L⁻¹, BASF) e Priori (Azoxistrobina a 250g L⁻¹, Syngenta) para determinação da EC₅₀ de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de *P. oryzae* do arroz

Espécie	Fungicidas	Concentrações (µg mL ⁻¹)							Total de doses
		0,00	0,30	0,75	0,90	1,80	4,10	6,80	
<i>Pyricularia graminis-tritici</i>	Tebuconazol	0,00	0,30	0,75	0,90	1,80	4,10	6,80	7
	Epoxiconazol	0,00	0,04	0,10	0,30	0,68	1,00	2,00	7
	Azoxistrobina	0,00	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,63	
		1,25	2,50	5,00	7,00	10,00	-	-	12
<i>P. oryzae</i>	Tebuconazol	0,0000	0,0025	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0750	
		0,1500	0,3000	-	-	-	-	-	9
	Epoxiconazol	0,0000	0,0013	0,0025	0,0050	0,0100	0,0200	0,0375	
		0,0750	0,1120	-	-	-	-	-	9

esporos foi mantida por dezoito horas em câmara de crescimento a 24°C e 12 h de fotoperíodo para a germinação dos esporos. No experimento com o fungicida azoxistrobina IQe, ao caldo BD (20,7 g L⁻¹ batata-dextrose) foi acrescido 0,5 mM de ácido salicílico-hidroxiâmico (SHAM), fundamental para suprimir a via alternativa da oxidase acompanhando os procedimentos relatados por Ma *et al.* (20). As concentrações dos fungicidas utilizadas (Tabela 2) foram pré-determinadas em experimento piloto. O crescimento dos isolados foi determinado com base na absorbância de luz à 620 nm obtida no leitor de microplacas descrito acima, 96 h após o início do experimento. Os valores obtidos foram utilizados para cálculo da EC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento do micélio) de cada isolado, e para cada fungicida, por meio do programa ED₅₀ plus v1.0 (29). Os experimentos consistiram de blocos casualizados, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi repetido uma vez. A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5% de probabilidade, foram efetuados no ambiente R com o uso do pacote estatístico Agricolae (26).

A eficiência relativa no uso de recursos com o método de microplacas e com o de placas de Petri foi determinada e os custos operacionais efetivo (COE) e total (COT) comparados, como proposto por (22). O COE foi composto das despesas com mão de obra e materiais utilizados em laboratório para ambos os métodos. Já o COT foi composto pelo COE, acrescido de outras despesas calculadas, bem como da depreciação estimada pelo método linear, proporcional ao período de utilização mensal do laboratório, em relação ao conjunto de elementos correspondentes ao capital fixo da atividade associados à vida útil de cada bem permanente.

Essa informação é relevante para os laboratórios interessados em implementar e oferecer serviços de detecção de resistência a fungicidas em populações de patógenos no país usando método semelhante de análise. É relevante, também, para os produtores rurais, potenciais usuários finais desse serviço de detecção. Os

preços empregados foram em moeda Dólar (US\$), referente ao dia 14 de julho de 2017.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

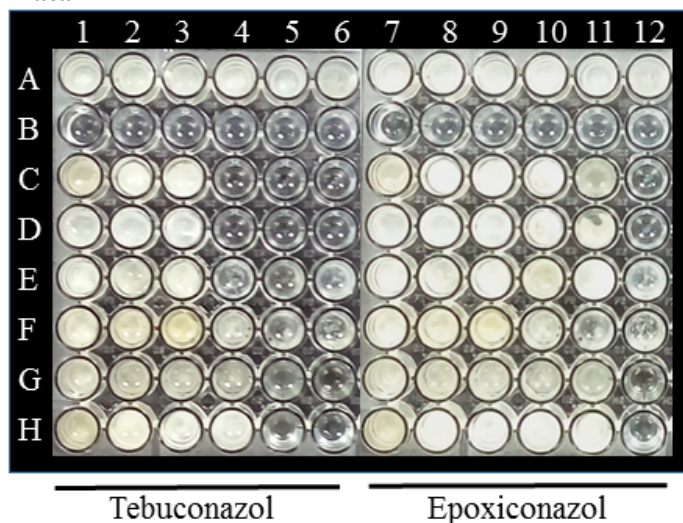
Provavelmente este é o primeiro estudo em que se propõe o uso do método de microplaca para discriminação entre os fenótipos de resistência e de sensibilidade a fungicidas triazóis e estrobirulinas em populações de *Pygt* e *Po* (Figura 1), com o objetivo de nortear a tomada de decisão quanto ao manejo químico da brusone do trigo no Brasil. Sob o ponto de vista qualitativo, o grupo de isolados de *Po* descritos como sensíveis aos fungicidas IDM triazóis pelo método de placas de Petri (25), também foi caracterizado como sensível quando avaliado pelo método de microplaca.

Analisando-se a curva dose-resposta média, foi possível discriminar o grupo de isolados de *Pygt* descritos como resistentes a triazóis (25) do grupo dos isolados de *Po* sensíveis a triazóis, demonstrando a acurácia do método de microplacas (Figura 2).

Estes isolados apresentaram valores de absorbância para a curva dose-resposta decrescendo de 2,007 para 0 em função do incremento de doses do fungicida entre 0 e 0,16 µg mL⁻¹ de azoxistrobina. Por sua vez, os cinco isolados de *Pygt* (12.1.028, 12.1.030, 12.1.068, 12.1.127, 12.1.146) classificados por Oliveira *et al.* (24) como resistentes no método de placas de Petri foram também resistentes pelo método de microplacas, tendo sido detectados valores de absorbância para a curva dose-resposta decrescendo de 1,120 para o mínimo de 0,20 na dose de 10 µg mL⁻¹. Verificou-se que esses isolados resistentes a azoxistrobina apresentam crescimento micelial em todas as doses do produto, o que não ocorreu com os isolados sensíveis.

Sob o ponto de vista quantitativo, de forma geral para os três fungicidas testados, os valores de EC₅₀ para o método de microplacas foram significativamente menores em comparação com o método de placas de Petri, dentro do grupo fenotípico resistente (Figura 3).

Placa A



Placa B



Figura 1. Representação visual do crescimento de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* *in vitro* em microplacas contendo caldo BD com diferentes concentrações dos fungicidas IDM triazóis, tebuconazol e epoconazol (placa A) e IQe azoxistrobina (placa B).

Placa A: Linha A, controle positivo contendo caldo BD sem o fungicida tebuconazol, com diferentes isolados de *Pygt* nas posições A1 a A6, e caldo BD sem o fungicida tebuconazol, com os mesmos isolados de *Pygt* nas posições de A7 a A12; linha B, controle negativo para isolados contendo caldo BD com doses diferentes dos fungicidas tebuconazol (posições B1 a B6) ou epoconazol (posições B7 a B12), descritas Tabela 2); linhas C a H, contém diferentes isolados de *Pygt* e os números de C1 a C6, ..., H1 a H6 representam as doses crescentes de tebuconazol, e de C7 a C12, ..., H7 a H12, doses crescentes do fungicida epoconazol.

Placa B: Linha A, controle positivo contendo caldo BD sem o fungicida azoxistrobina, com diferentes isolados de *Pygt* nas posições A1 a A6, e poços vazios nas posições A7 a A12; linha B, controle negativo para isolados com doses do fungicida azoxistrobina (posições B1 a B11); nas linhas C, D e E, isolados resistentes, linhas F, G e H, isolados sensíveis à azoxistrobina; e os números de 1 a 11 representam as doses crescentes de azoxistrobina.

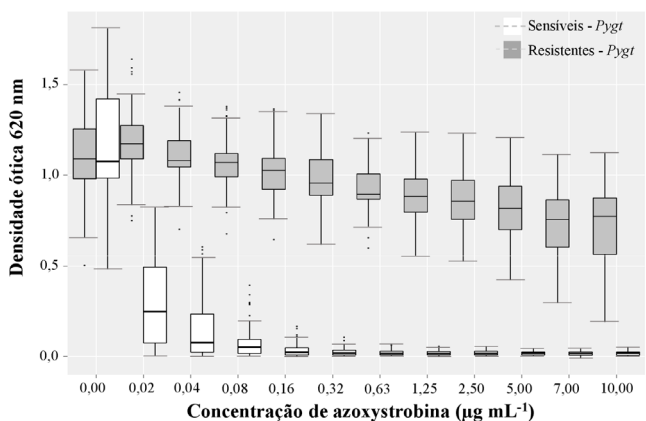
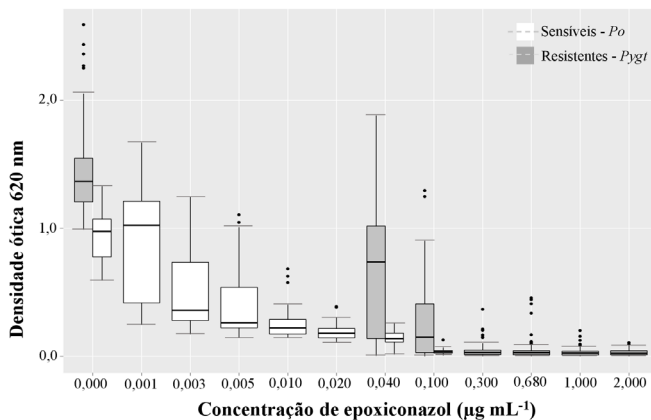
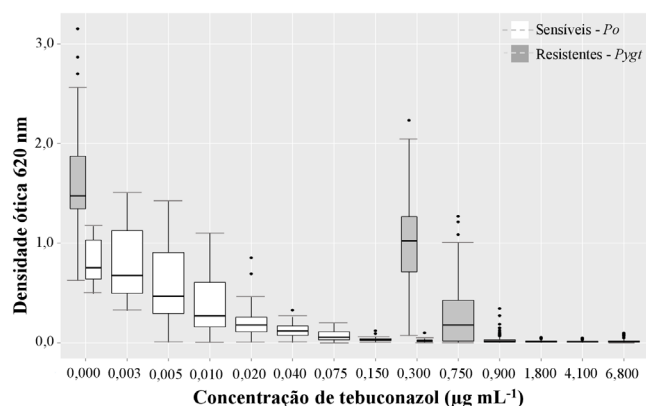


Figura 2. Curva dose-resposta do crescimento de *Pyricularia graminis-tritici* (*Pygt*) e *P. oryzae* (*Po*) expresso em unidade de densidade ótica em função de doses dos fungicidas tebuconazol e epoxiconazol (IDM) e azoxistrobina (IQe) ^{a,b}.

^aPara fungicidas IDM triazóis, média de $N=13$ isolados resistentes de *Pygt* e $N=4$ isolados sensíveis de *Po*. ^bPara fungicidas IQe estrobirulinas, média de $N=5$ isolados resistentes e $N=8$ isolados sensíveis de *Pygt*.

Em média, para o método de microplaca, a EC_{50} de isolados resistentes foi de $0,14 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ de epoxiconazol, $0,61 \pm 0,19 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tebuconazol e $7,06 \pm 8,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ de azoxistrobina. Já para o método de placas de Petri, observou-se valores significativamente maiores de EC_{50} para isolados resistentes, como se segue: $1,22 \pm 0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ de epoxiconazol, $1,24 \pm 0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tebuconazol e $34,01 \pm 29,93 \mu\text{g mL}^{-1}$ de azoxistrobina (Figura 3).

Por sua vez, não houve diferença significativa entre métodos dentro do grupo fenotípico sensível. Em média, para o método de microplaca, a EC_{50} de isolados sensíveis foi de $0,0074 \pm 0,0035 \mu\text{g mL}^{-1}$

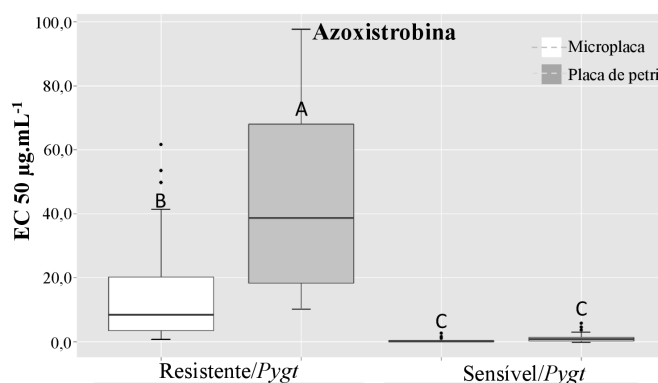
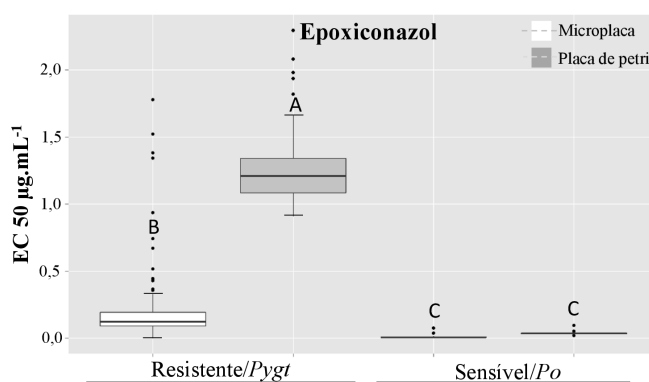
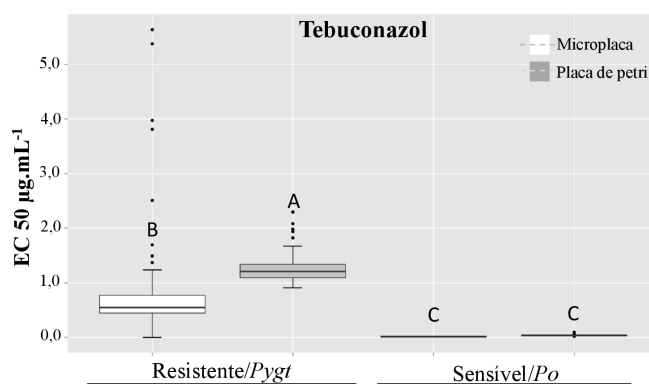


Figura 3. Boxplots representando a variação dos valores de EC_{50} de grupos de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* e *P. oryzae* resistentes ou sensíveis aos fungicidas IDM triazóis (tebuconazol e epoxiconazol) ou IQe estrobirulinas (azoxistrobina) de acordo com método de microplacas (boxplot branco) e o método de placas de Petri (boxplot cinza) ^{a, b, c}.

^aA linha horizontal dentro do boxplot representa os valores das medianas correspondentes ao número de isolados de cada categoria e 10 repetições por grupo de isolados. ^bMedianas para grupos de isolados obtidas com $N=13$ isolados de *Pygt* resistentes e $N=4$ isolados de *Po* sensíveis a triazóis. ^cMedianas para grupos de isolados obtidas com $N=5$ isolados de *Pygt* resistentes e $N=8$ isolados sensíveis a azoxistrobina. ^dOs boxplots com as mesmas letras indicam que as médias de métodos, dentro de grupo fenotípico, não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott para comparação de médias a $p < 0,05$.

de epoxiconazol, $0,014 \pm 0,0059 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tebuconazol, e $1,47 \pm 2,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de azoxistrobina. Em comparação, para o método de placas de Petri, para isolados sensíveis observou-se EC_{50} de $0,034 \pm 0,0062 \mu\text{g mL}^{-1}$ de epoxiconazol, $0,034 \pm 0,0062 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tebuconazol e $1,02 \pm 5,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ de azoxistrobina (Figura 3).

Muito embora com valores de EC_{50} significativamente menores, o método da microplaca foi semelhantemente acurado e de precisão superior ou similar (expressa pelos desvio da médios), permitindo discriminar os fenótipos de resistência dos de sensibilidade dos isolados de *Pygt* e/ou *Po* aos fungicidas tebuconazol, epoxiconazol e azoxistrobina (efeito significativo de grupos fenotípicos, Tabela 3). Reproduziu-se, assim, as observações dos estudos anteriores utilizando

fenotipagem pelo método de placas de Petri (24; 25).

Ainda quantitativamente, pelo método de microplaca detectou-se diferenças significativas entre isolados de *Pygt* e/ou *Po* dentro dos grupos fenotípicos resistentes e sensíveis aos fungicidas tebuconazol, epoxiconazol e azoxistrobina, assim como detectado anteriormente usando-se o método de placas de Petri (Tabela 3).

Em seguida foi comparado o tempo para execução das técnicas de microplacas e de placas de Petri considerando a caracterização fenotípica de 30 isolados do patógeno, conforme fluxograma apresentado na Figura 4. O método de microplacas demandou 30 dias para se completar a fenotipagem dos 30 isolados, enquanto o de placas de Petri demandou 23 dias. Entretanto, ambos os métodos possuíam

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) de valores de EC_{50} comparando-se o efeito dos métodos de microplacas e de placas de Petri, e de grupos de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* e de *P. oryzae* resistentes ou sensíveis aos fungicidas tebuconazol, epoxiconazol e azoxistrobina e as respectivas interações.

Fungicida	Fatores de variação	G.L.	Q.M.	F	p > F	
Tebuconazol	Métodos					
	Método da microplaca					
	Grupos fenotípicos	1	7,244	616,46	< 0,001 ***	
	Isolados (Grupo)	15	0,145	12,35	< 0,001 ***	
	Bloco	9	0,091	0,86	0,565	
	Resíduo	88	0,012			
	Método de placas de Petri					
	Grupos fenotípicos	1	26,297	1473,63	< 0,001***	
	Isolados (Grupo)	12	0,053	2,98	< 0,01 **	
	Bloco	7	0,104	5,83	< 0,001 ***	
	Resíduo	69	0,018			
	Epoxiconazol	Métodos				
		Método da microplaca				
		Grupos fenotípicos	1	0,4371	239,66	< 0,001***
Isolados (Grupo)		15	0,0154	8,42	< 0,001***	
Bloco		9	0,0050	2,74	< 0,01 **	
Resíduo		92	0,0018			
Método de placas de Petri						
Grupos fenotípicos		1	18,560	3957,77	< 0,001***	
Isolados (Grupo)		12	0,027	5,67	< 0,001***	
Bloco		7	0,027	5,68	< 0,001***	
Resíduo		58	0,005			
Azoxistrobina		Método				
		Método da microplaca				
		Grupos fenotípicos	1	2731,8	83,86	< 0,001***
	Isolados (Grupo)	11	41,6	0,46	0,255	
	Bloco	9	15,0	1,28	0,896	
	Resíduo	75	32,6			
	Método de placas de Petri					
	Grupos fenotípicos	1	41018,0	115,42	< 0,001***	
	Isolados (Grupo)	11	325,0	0,91	0,532	
	Bloco	7	403,0	1,13	0,354	
	Resíduo	65	355,0			

Em função de não ter sido detectado interação significativa entre réplicas dos experimentos e demais fatores, as réplicas foram combinadas.

***Significativa pelo teste F a $p \leq 0,001$.

**Significativa a $p \leq 0,01$.

atividades diárias que não ultrapassavam oito horas de trabalho, por exemplo o preparo de meio de cultura, a reativação de culturas fúngicas, a repicagem de culturas reativadas. Ainda, a incubação de culturas para crescimento micelial ou para produção de esporos, que varia de 7 a 15 dias, não demanda horas efetivas de trabalho e, portanto, permite a sobreposição de outros processos paralelos de fenotipagem, otimizando recursos e mão de obra disponível. No método de placas de Petri foi necessário um total de 52 h de trabalho, 14 h a mais que o requisitado para o método de microplacas, que totaliza 38 h. Especificamente, são necessárias mais horas para preparo de meio de cultura em placas de Petri, para o estabelecimento e para a avaliação do experimento (Figura 4).

Quanto aos componentes que geraram consumo de energia, o método de placas de Petri requereu maior tempo para autoclavagem de material, maior tempo de uso da câmara de fluxo laminar para estabelecimento dos experimentos, além de quantidade consideravelmente maior de estufas incubadora (quatro, ao invés de uma) que resultou em consumo de energia elétrica equivalente a três vezes o consumo pelo método de microplacas (Tabela 4).

Foram comparados ainda os custos de investimentos requeridos pelos dois métodos de detecção de resistência a fungicidas.

Considerando que o laboratório dispõe de equipamentos básicos, tais como uma autoclave, uma câmara de fluxo laminar e estufas incubadoras (no mínimo uma), o investimento inicial para o sistema de microplacas foi de US\$ 6.208,49 (leitor de microplaca e micropipetas) enquanto que para o sistema de placas de Petri foi de US\$ 1.382,39 (micropipetas). Entretanto, para implementar o método de placas de Petri o laboratório necessitaria de outras três incubadoras disponíveis. Não havendo disponibilidade, deve ser adicionado o custo de US\$ 4.575,47 para aquisição das incubadoras, totalizando US\$ 5.957,86.

Dado ao alto valor de capital fixo para implantação de qualquer um dos dois métodos, é necessário avaliar, de forma integral, as necessidades de cada laboratório ou grupo de pesquisa para inovar e implementar o uso destas técnicas de detecção de resistência a fungicidas. Com relação à composição do custo operacional efetivo (COE), para o método de microplacas o gasto com mão de obra representou 71,0% dos custos de insumos (Tabela 4), seguido da energia elétrica, que representou 15,1% dos custos. Já para o método da placa de Petri o gasto com mão de obra representou 46,5% dos custos enquanto a energia elétrica representou 30,8%. Destaca-se que o custo operacional total (COT) para o método de microplaca foi de US\$739,04 o qual é 33,0% inferior ao COT do método de placas de Petri (Tabela

Fluxograma de atividades		Métodos de fenotipagem		Microplaca		Placa de petri	
Dia	Atividades	Tempo (dias desde o início das atividades)	Horas de trabalho despendidas por atividade no método (h)	Tempo (dias desde o início das atividades)	Horas de trabalho despendidas por atividade no método (h)	Tempo (dias desde o início das atividades)	Horas de trabalho despendidas por atividade no método (h)
1	Preparo de meio para reativar culturas fúngicas	1	4	1	4	1	4
2	Reativação de culturas fúngicas	1	4	1	4	1	4
3	Incubação de culturas fúngicas reativadas	7	1	7	1	7	1
8	Preparo de meio de cultura para produção de inóculo	1*	8	1	8	1	8
9	Repicagem de culturas reativadas	1	8	1	8	1	8
10	Incubação de culturas para produção de esporos para microplacas / Incubação de culturas para crescimento micelial de inóculo para placas de petri	15 -	1 -	7 -	- 1	7 -	- 1
15	Preparo de meio e distribuição para experimentos em placas de Petri	-	-	1	8	1	8
16	Estabelecimento de experimento em placas de petri	-	-	1	8	1	8
17	Incubação de culturas em placas de petri	-	-	7	2	7	2
23	Avaliação de experimento de placas de petri	-	-	1	8	1	8
25	Preparo e distribuição de meio de cultura em microplacas / Estabelecimento de experimento em microplacas	0,5 0,5	4 4	- -	- -	- -	- -
26	Incubação de culturas fúngicas em microplacas	5	1	-	-	-	-
30	Avaliação de experimento em microplacas	1	2	-	-	-	-
Total			38 h		52 h		52 h

Figura 4. Cronograma comparativo de atividades para estabelecimento de experimentos de detecção de resistência à fungicidas *in vitro* pelos métodos de microplaca e placa de Petri, 2017^a

^a As barras cinza e branca indicam duração das atividades consecutivas em cada método.

Tabela 4. Valores detalhados de custo discriminando gastos de energia e tempo dispendido em cada atividade para os métodos de microplaca e de placa de Petri, 2017

Ítem e detalhamento das atividades geradoras de consumo de energia	Microplacas			Placas de Petri		
	Potência kW ^a	Horas	Valor (US)	Potência kW ^a	Horas	Valor (US)
1. Energia consumida pelo uso da autoclave ^b	2,7	1	1.02	2,7	4	4.10
2. Energia consumida pelo uso da câmara de fluxo laminar ^c	0,4	4	0.6	0,4	10	1.52
3. Energia consumida pelo uso de incubadoras tipo BODs ^d	0,4	648	98.62	1,6	504	306.83
4. Tempo de avaliação de experimento em leitor de microplaca	0,06	0,25	0.003	-	8	-
Total	-	-	100.24	-	-	312.45

^a Para cálculo do valor final foi utilizado a tarifa de alta tensão disponível no site <http://www.elektro.com.br>, no valor de (R\$ 1,21, equivalente a US\$0.38). ^b Utilizada para preparo de meios de cultura e esterilização de material; ^c Utilizada para distribuição de meio de cultura, repicagem de culturas, estabelecimento e avaliação de experimento; ^d Utilizada para incubação de culturas em microplacas (uma incubadora) ou em placas de Petri (quatro incubadoras); ^e Utilizada para avaliação de experimentos em microplacas.

Tabela 5. Estimativa de custos considerando o número de 30 isolados para os métodos de microplaca e placa de Petri para detecção de resistência a fungicidas em populações de fungos fitopatogênicos, 2017.

Descrição	Método de microplacas				Método de placas de Petri			
	Quantidade (Unidades ou gramas)	Valor Unit. (US)	Valor Total (US)	%	Quantidade (Unidades ou gramas)	Valor Unit. (US)	Valor Total (US)	%
Mão de Obra	1	471.69	471.69	70,99	1	471.69	471.69	46,54
Energia elétrica	-	-	100.24	15,09	-	-	312.45	30,83
Microplacas de cultura (96 poços)	5	1.41	7.07	1,06	0	0,00	0,00	-
Placas de Petri descartáveis 90x15mm	180	0.15	28.30	4,26	810	0.15	127.35	12,56
Ponteira de 20-200 µL, com filtro	60	0.07	4.52	0,68	12	0.07	0.90	0,09
Ponteira de 0.5-10 µL, com filtro	60	0.06	3.96	0,60	12	0.06	0.79	0,08
Tubos falcons (15 ml)	60	0.17	10.56	1,59	0	0,00	0,00	-
Botijão de gás	1	16.98	16.98	2,56	1	16.98	16.98	1,68
Caldo Batata dextrose (500g)	68,31g	78.30	10.69	1,60	232,87g	78.30	36.46	3,60
Agar (500g)	37,5g	139.10	10.43	1,57	168,75g	139.10	46.94	4,63
Custo Operacional Efetivo (COE)			664.44				1,013.56	
Outras Despesas (5% COE)			41.38				39.71	
Depreciação Linear			33.22				50.68	
Custo Operacional Total (COT)			739.04	100			1,103.95	100

5).

Outras contribuições científicas na área de detecção de resistência de fitopatogênicos a fungicidas em outros patossistemas advogam favoravelmente pela utilização do método de microplacas. Segundo Vega *et al.* (30), o método de microplacas para análise da sensibilidade de *Alternaria alternata* de tangerinas à fungicidas QoI teve vantagens sobre o método convencional de placas de Petri, pois permitiu a avaliação de múltiplos isolados e concentrações seriadas de fungicidas ao mesmo tempo. Já Cox *et al.* (8) qualificaram e quantificaram a sensibilidade de *Monilinia fructicola* a fungicidas triazóis usando o método de microplacas. Segundo os autores, o método pode ser considerado acurado, rápido e de fácil reprodução quando comparado aos métodos convencionais.

Conclui-se, com esse estudo, que o método da microplaca permitiu discriminar com acurácia e maior rapidez os fenótipos de resistência e sensibilidade a triazóis e estrobirulinas em populações de isolados do patógeno da brusone do trigo.

O método de microplacas foi, também, mais eficiente no uso de recursos, com custo operacional inferior ao do método de placas de Petri. Em conjunto, os fatores acurácia, rapidez e eficiência no uso de recursos indicam que o método de microplaca pode ser incorporado no desenvolvimento de um sistema de monitoramento da sensibilidade a fungicidas em populações do fungo da brusone do trigo no agroecossistema brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado por auxílios à pesquisa da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) a P. C. Ceresini (2013/10655-4 e 2015/10453-8) e da Embrapa/Monsanto Macrograma II (SEG 02.11.04.006.00.00) a J. L. N. Maciel. P.C. Ceresini é Pesquisador Pq-2 do CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Pq-2 307361/2012-8 e

307295/2015-0). V. L. Castroagudin foi bolsista de pós-doutorado pelo convênio FAPESP/CAPES (2014/25904-2). G. Carvalho foi bolsista de pós-doutorado do Programa PNPd - CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGA) da UNESP Campus de Ilha Solteira. P. S. Casado foi bolsista de mestrado da CAPES pelo PPGA. S. N. C. Vicentini é bolsista de mestrado da FAPESP (2017/03403-0) no PPGA. Agradecemos à CAPES por conceder auxílio para estabelecimento do “Centro de Diversidade Genética no Agroecossistema” (Proequipamentos 775202/2012).

REFERÊNCIAS

1. Arikan, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Medical Mycology**, Wilmington, v.45, p.495-587, 2007.
2. Bampi, D.; Casa, R.T.; Wordell Filho, J.A.; Blum, M.M.C.; Camargo, M.P. Sensibilidade de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.29, n.4, p.787-795, 2013.
3. Botelho, T.S.; Lourenço, F.R.; Pinto, T.J.A. Vancomycin microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Current Pharmaceutical Analysis**, Saif Zone, v.9, n.2, p.172-176, 2013.
4. Broekaert, W.F.; Terras, F.R.G.; Cammue, B.P.A.; Vanderleyden, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.69, p.55-60, 1990.
5. 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**, Saint Paul, v.105, n.3, p.284-294, 2015.
6. Cools, H.J.; Bayon, C.; Atkins, S.; Lucas, J.A.; Fraaije, B.A. Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (*MgCYP51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. **Pest Management Science**, West Sussex, v.68, n.7, p.1034-1040, 2012.
7. Cools, H.J.; Parker, J.E.; Kelly, D.E.; Lucas, J.A.; Fraaije, B.A.; Kelly, S.L. Heterologous expression of mutated eburicol 14 α -demethylase (*CYP51*) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, n.9, p.2866-2872, 2010.
8. Cox, K.D.; Quello, K.; Deford, R.J.; Beckerman, J.L. A rapid method to quantify fungicide sensitivity in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.93, p.328-331, 2009.
9. Deising, H.B.; Reimann, S.; Pascholati, S.F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.39, p.286-295, 2008.
10. Dorigan, A.F.; Carvalho, G.; Poloni, N.M.; Negrisoni, M.M.; Maciel, J.L.N.; Ceresini, P.C. Resistance to triazole fungicides in *Pyricularia* species associated with invasive plants from wheat fields in Brazil. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.40, n.2, 2018.
11. Estep, L.K.; Torriani, S.F.F.; Zala, M.; Anderson, N.P.; Flowers, M.D.; McDonald, B.A.; Mundt, C.C.; Brunner, P.C. Emergence and early evolution of fungicide resistance in North American populations of *Zymoseptoria tritici*. **Plant Pathology**, Oxford, v.64, n.4, p.961-971, 2015.
12. Forcelini, C.A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.335-355, 1994.
13. Forcelini, C.A.; Goellner, C.I.; May-De Mio, L.L. Resistência de fungos a fungicidas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.9, p.339-381, 2001.
14. Fraaije, B.A.; Bayon, C.; Atkins, S.; Cools, H.J.; Lucas, J.A.; Fraaije, M.W. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control *Septoria* leaf blotch in wheat. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.13, n.3, p.263-275, 2012.
15. Fraaije, B.A.; Cools, H.J.; Kim, S.H.; Motteram, J.; Clark, W.S.; Lucas, J.A. A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (*CYP51*) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.8, n.3, p.245-54, 2007.
16. Leroux, P.; Albertini, C.; Gautier, A.; Gredt, M.; Walker, A.-S. Mutations in the *CYP51* gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, West Sussex, v.63, n.7, p.688-698, 2007.
17. Lourenço, F.R.; Pinto, T.J.A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.47, n.3, p.573-584, 2011.
18. Lucas, J.A.; Hawkins, N.J.; Fraaije, B.A. The evolution of fungicide resistance. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.90, p.29-92, 2015.
19. Ludwig, A.; Boller, T. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.69, p.61-66, 1990.
20. Ma, Z.; Proffer, T.J.; Jacobs, J.L.; Sundin, G.W. Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.4, p.2581-2585, 2006.
21. Maciel, J.L.N.; Ceresini, P.C.; Castroagudin, V.L.; Zala, M.; Kema, G.H.J.; McDonald, B.A. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v.104, n.1, p.95-107, 2014.
22. Matsunaga, M.; Bemelmans, P.F.; Toledo, P.E.N.; Dulle, R.D.; Okawa, H.; Pedrosa, I.A. Metodologia de custo de produção utilizada pelo IEA. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v.23, n.1, p.123-139, 1976.
23. May-De Mio, L.L.; Luo, Y.; Michailides, T.J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. **Plant Disease**, Saint Paul, v.95, n.7, p.821-827, 2011.
24. 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, p.298-304, 2015.
25. Poloni, N.M.; Carvalho, G.; Dorigan, A.F.; Maciel, J.L.N.; McDonald, B.A.; Ceresini, P.C. Widespread distribution of resistance to triazole fungicides in populations of the wheat blast pathogen in Brazil and evolution of the *cyp51A* gene. In: International workshop on wheat blast, 2., 2016, Florianópolis. Book of Abstracts. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2016. p.152-152.
26. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Roundation for Statistical Computing, 2013.
27. Rekanovic, E.M.M.; Potocnik, I. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiophanate-methyl. **Pesticides Phytomedicine**, Beograd, v.25, p.325-333, 2010.
28. Van Den Bosch, F.; Oliver, R.; Van Den Berg, F.; Paveley, N. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.52, n.1, p.175-195, 2014.
29. Vargas, M.H. **ED50plus v1.0**. Mexico City: Instituto Nacional de Enferme medades Respiratorias, 2000.
30. Vega, B.; Libertini, D.; Harmon, P.F.; Dewdney, M.M. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate QoI sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. **Plant Disease**, Saint Paul, v.96, p.1262-1270, 2012.