**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Modelo determinístico e análise de incerteza para predição do
tempo de resistência de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas
inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) na cultura da soja**

Sergio Zanon da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2017**

Sergio Zanon da Silva
Engenheiro Agrônomo

**Modelo determinístico e análise de incerteza para predição do tempo de
resistência de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da succinato
desidrogenase (SDHI) na cultura da soja**

Orientador:
Prof. Dr. **DURVAL DOURADO NETO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Sergio Zanon da

Modelo determinístico e análise de incerteza para predição do tempo de resistência de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) na cultura da soja / Sergio Zanon da Silva. - - Piracicaba, 2017.

80 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ferrugem Asiática 2. Modelos matemáticos 3. Monte Carlo 4. Carboxamidas I. Título

DEDICATÓRIA

DEDICO

Aos meus pais Manuel Assis da Silva e Jane Mara Zanon da Silva pelo amor incondicional, e

À minha noiva Carla Fabina Fabrini por todo amor, carinho e compreensão, dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos e pensamentos.

Aos meus amados pais, Manuel Assis da Silva e Jane Mara Zanon da Silva, pelos valores éticos transmitidos ao longo de toda minha vida e incentivo à educação.

À minha amada noiva, Carla Fabiana Fabrini, por todos os momentos compartilhados, alegrias e tristezas, pela cumplicidade e todo amor. Saiba que é recíproco.

Ao meu orientador Dr. Durval Dourado Neto por todo ensinamento, compreensão, apoio e, principalmente, amizade durante toda a jornada de trabalho.

À professora Dra. Sônia Maria De Stefano Piedade por todo ensinamento e companheirismo durante a elaboração do projeto de pesquisa

Ao professor Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias por transmitir conhecimentos valiosos e que foram fundamentais para a execução do trabalho

EPÍGRAFE

"Toda sabedoria vem de Deus, ela sempre esteve com Ele.
A sabedoria inspira a vida de seus filhos e toma sob a sua proteção aqueles que a procuram".

(Eclesiástico 4, 12-22)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.2 Características dos fungicidas sistêmicos utilizados na cultura da soja.....	21
2.2.1 Inibidores da Desmetilação (DMIs).....	21
2.2.2 Inibidores da Quinona externa (Qol).....	22
2.2.2 Inibidores da Succinato Desidrogenase (SDHI).....	23
2.3 Modelos matemáticos	24
2.4 Modelos epidemiológicos	24
2.4.1 Modelo exponencial.....	25
2.4.2 Modelo logístico.....	25
2.4.3 Modelo de Gompertz	26
2.4.4 Modelo monomolecular	27
2.5. Modelos preditivos para resistência a fungicidas	27
2.4.1 Modelo de Milgroom	28
2.4.2 Modelo de Skylakakis	28
2.5. Incerteza em modelos matemáticos e distribuições de probabilidades utilizadas	29
2.5.1 Distribuição uniforme	30
2.5.2 Distribuição beta	30
2.6. Conceitos de resistência de fungos a fungicidas.....	31
2.6.1 Resistência de fungos a fungicidas inibidores de SDHI.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Modelo determinístico	39
3.1.1 Pressuposições do modelo.....	39
3.1.2 Crescimento populacional e Frequência gênica na ausência de forças evolutivas.....	40
3.1.3 Relação entre período cronológico e período biológico.....	42
3.1.5 Período inicial de resistência	45
3.1.4 Simulação de cenários para forças evolutivas e estimativa de T_{aRP} e T_{aAR}	45
3.1 Modelo determinístico e análise de incerteza	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

4.1 Análise de Cenários – Modelo Determinístico	51
4.1.1 CI: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes números de aplicações de fungicidas (Naplic).....	51
4.1.1 CII: Cálculo de T_{aRP} para diferentes valores de $Freq_{iMR}$	54
4.1.1 CIII: Cálculo de T_{aAR} para diferentes valores de $Freq_{iR}$	56
4.1.1 CIV: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes valores de $\gamma_{S,R}$ e $\gamma_{MR,R}$	59
4.1.1 CV: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes α_S e α_{MR}	60
4.1.1 CVI: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes m_r e m_{mr}	62
4.1.1 CVII: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes valores de λ_r , e λ_{mr}	66
4.2 Análise de cenários considerando incertezas	68
5 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

RESUMO

Modelo determinístico e análise de incerteza para predição do tempo de resistência de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) na cultura da soja

A utilização de modelos matemáticos na agricultura é de fundamental importância para o desenvolvimento do setor agrícola. O fungo *Phakopsora pachyrhizi* configura-se como um importante patógeno que parasita a cultura da soja, causando prejuízos bilionários ao agronegócio brasileiro. Na última década, observou-se a rápida perda de eficácia dos principais fungicidas utilizados para seu controle, caracterizando um processo de resistência para os fungicidas DMIs e QoI. Recentemente, novas moléculas foram introduzidas no mercado para a cultura da soja – fungicidas inibidores da Succinato Desidrogenase (SDHI) – com o objetivo de aumentar os níveis de controle sobre o patógeno. Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo a elaboração de um modelo determinístico com análise de incerteza que possibilitasse a previsão do tempo de resistência (longevidade) do patógeno para os novos fungicidas, contribuindo, dessa forma, para a elaboração de novas estratégias de manejo a fim de proporcionar maior vida útil a tais moléculas.

Palavras-chave: Ferrugem Asiática; Modelos matemáticos; Monte Carlo; Carboxamidas

ABSTRACT

Deterministic model and uncertainty analysis to predict the resistance time of *Phakopsora pachyrhizi* to succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides in soybean

The use of mathematical models in agriculture have fundamental importance for the development of the agricultural sector. The fungus *Phakopsora pachyrhizi* is an important pathogen which parasitizes the soybean crop, causing billions of losses to Brazilian agribusiness. In the last decade, it was observed the rapid loss of effectiveness of the main fungicides used for its control, characterizing a resistance process for the fungicides DMIs and QOI. Recently, new molecules were introduced to the soybean crop - Succinate Dehydrogenase (SDHI) inhibitor fungicides whose the objective is increase the efficiency over the pathogen. In this context, the objective of this work was the elaboration of a deterministic model with uncertainty analysis that would allow the prediction of the resistance time (longevity) of the pathogen to the new fungicides, thus contributing to the elaboration of new management strategies to provide longer life to such molecules.

Keywords: Soybean rust; Mathematical models; Monte Carlo; Carboxamides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	20
Figura 2. Representação simplificada da enzima SDH e suas subunidades	34
Figura 3. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de Naplic: (a) Naplic=1, (b) Naplic=2, (c) Naplic=3, (d) Naplic=6	53
Figura 4. Relação entre Naplic e Tempo para Resistência	54
Figura 5. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de FreqiMR: (a) $\text{FreqiMR} = 10^{-5}$, (b) $\text{FreqiMR} = 10^{-1}$	55
Figura 6. Relação entre FreqiMR e TaRP	56
Figura 7. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de FreqiR: (a) $\text{FreqiR} = 10^{-12}$, (b) $\text{FreqiMR} = 10^{-4}$	58
Figura 8. Relação entre FreqiMR e TaAR	59
Figura 9. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de α_S : (a) $\alpha_S = 0,6$, (b) $\alpha_S = 0,9$	61
Figura 10. Relação entre α_S e Tempo para a Resistência	61
Figura 11. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de mmr: (a) $\text{mmr} = \text{mr} = 0$, (b) $\text{mr} = 0,4$, (c) $\text{mmr} = 0,4$	65
Figura 12. Relação entre taxa de mortalidade (mr e mmr) e Tempo para a Resistência	66
Figura 13. Relação entre Taxa de Sobrevivência e Tempo para a Resistência	67
Figura 14. Histograma representando TaAR (a) e TaRP (b) para o cenário C1	71
Figura 15. Histograma representando TaAR (c) e TaRP (d) para o cenário C2	72
Figura 16. Histograma representando TaAR (e) e TaRP (f) para o cenário C3	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nome científico dos principais hospedeiros de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	18
Tabela 2. Relatos de resistência de fungos a fungicidas SDHI compilados pelo FRAC (2015).....	36
Tabela 3. Cenários (C) e valores das principais variáveis consideradas no modelo.	46
Tabela 4. Distribuições de Probabilidade e Cenários considerando incertezas para as principais variáveis	48
Tabela 5. Intervalo considerado para as variáveis no truncamento da distribuição beta	49
Tabela 6. Valores atribuídos para as demais variáveis não consideradas na análise de incerteza.....	50
Tabela 7. Influência do número médio de aplicações de fungicidas (Naplic) no tempo de resistência (TaRP e TaAR)	51
Tabela 8. Influência de FreqiMR no tempo de resistência (TaRP e TaAR)	54
Tabela 9. Influência de FreqiMR no tempo de resistência (TaRP e TaAR)	56
Tabela 10. Valores de TaAR para diferentes combinações de $\gamma_{S,R}$ e $\gamma_{MR,R}$	59
Tabela 11. Influência de α_S no tempo de resistência (TaRP e TaAR) para $\alpha_{MR} = 0,660$	
Tabela 12. Influência de α_{MR} no tempo de resistência (TaRP e TaAR) para $\alpha_S = 0,962$	
Tabela 13. Influência do custo adaptativo na reprodução de indivíduos R (mr) sobre o tempo de resistência (T_{aAR} e TaRP) para $mmr=ms=0$	63
Tabela 14. Influência do custo adaptativo na reprodução de indivíduos MR (mmr) sobre o tempo de resistência (TaAR) para $mr=ms=0$	63
Tabela 15. Influência de λ_r , no tempo de resistência (TaRP e TaAR) para $\lambda_{mr} = 1$...	66
Tabela 16. Influência de λ_{mr} no tempo de resistência (TaRP e TaAR) para $\lambda_r = 1$	66
Tabela 17. Estimativas de $E(TaAR)$, $Var(TaAR)$, $E(TaRP)$, $Var(TaAR)$ para os cenários estocásticos.....	69

LISTA DE SÍMBOLOS

r_E	Taxa de reprodução do patógeno (Modelo Exponencial)
r_L	Taxa de reprodução do patógeno (Modelo Logístico)
r_G	Taxa de reprodução do patógeno (Modelo de Gompertz)
r_M	Taxa de reprodução do patógeno (Modelo de Monomolecular)
S	Indivíduos suscetíveis
MR	Indivíduos moderadamente resistentes
R	Indivíduos resistentes
$N_{(t=0)}$	Número de indivíduos totais iniciais (antes da utilização de fungicidas)
$MR_{(t=0)}$	Número de indivíduos MR iniciais
$R_{(t=0)}$	Número de indivíduos R iniciais
$S_{(t=0)}$	Número de indivíduos S iniciais
$Freq_{iMR}$	Frequência alélica inicial de indivíduos MR
$Freq_{iR}$	Frequência alélica inicial de indivíduos R
r_S	Número de esporos produzidos por indivíduos S em um período t
ms	Taxa de mortalidade de indivíduos S em um período t
mmr	Taxa de mortalidade de indivíduos MR em um período t
mr	Taxa de mortalidade de indivíduos R em um período t
$FreqS_{(t)}$	Frequência alélica de indivíduos S em um dado período t
$FreqMR_{(t)}$	Frequência alélica de indivíduos MR em um dado um período t
$FreqR_{(t)}$	Frequência alélica de indivíduos MR em um dado um período t
$N_{ger.safra}$	Número de geração do patógeno ao longo de um ano safra
Cc	Período do ciclo biológico do genótipo de soja utilizado
tinst	Período em que foram observados os primeiros sintomas da doença no ciclo biológico do genótipo

C_p	Período do ciclo biológico do patógeno para dar origem a uma nova geração
N_s	Número de ciclos agrícolas (safras)
$\gamma_{S,S}$	Frequência de geração de indivíduos S
$\gamma_{MR,S}$	Frequência de mutação de indivíduos MR para S
$\gamma_{MR,MR}$	Frequência de geração de indivíduos
$\gamma_{S,MR}$	Frequência de mutação de indivíduos S para MR
$\gamma_{S,MR}$	Frequência de mutação de indivíduos S para MR
$\gamma_{S,R}$	Frequência de mutação de indivíduos S para R
$\gamma_{MR,R}$	Frequência de mutação de indivíduos MR para R
α_S	Eficiência inicial do fungicida para indivíduos S
α_{MR}	Eficiência inicial do fungicida para indivíduos MR
N_{aplic}	Número de aplicações de fungicidas em um ano safra
λ_s	Taxa de sobrevivência para indivíduos S
λ_{mr}	Taxa de sobrevivência para indivíduos MR
λ_r	Taxa de sobrevivência para indivíduos R
T_{aRP}	Período, em anos, quando $FreqS_{(t)} \leq FreqMR_{(t)}$
T_{aAR}	Período, em anos, quando $FreqS_{(t)} \leq FreqR_{(t)}$

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das principais doenças da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.], causando perdas de rendimentos variando entre 10 a 90% (SINCLAIR & HARTMAN, 1999; YORINORI et al., 2005 apud GODOY et al., 2009).

A introdução do fungo em território brasileiro data o ano de 2001 e alterou as estratégias de manejo de doenças em virtude da alta complexidade e taxa de reprodução do patógeno em questão, culminando em perdas severas de produtividade em curto período de tempo. Em razão de tais características, instituições de pesquisa e indústrias de desenvolvimento de defensivos realizam inúmeros trabalhos a fim de elucidar características biológicas e comportamentais do fungo, afim de melhor estudar seus principais mecanismos de adaptação e resistência em relação às principais moléculas de fungicidas.

Segundo circular técnico da EMBRAPA (2011), o custo para o controle da ferrugem asiática da soja varia entre 1,8% a 3,8% do custo de produção total, o que corresponde, para o Brasil, um valor estimado de aproximadamente 2 bilhões de dólares por safra. Além disso, desde o seu descobrimento, verifica-se redução da eficácia dos fungicidas utilizados para o seu controle, havendo diversos relatos de resistência de *P. pachyrhizi* a alguns dos principais grupos químicos de fungicidas, sendo estes majoritariamente pertencentes aos grupos dos triazóis (DMIs) e estrobilurinas (QoI) (BRENT; HOLLOMON, 2007).

Com o intuito de manter os níveis de controle abaixo de um limiar de dano econômico e proporcionar novas alternativas para o manejo de resistência do patógeno, um grupo químico ainda não utilizado no manejo de *P. pachyrhizi* foi introduzido no mercado, sendo classificados pelo FRAC, no grupo dos Inibidores da Succinato Desidrogenase (SDHI) (FRAC, 2016) Esse grupo atua inibindo a ação da enzima succinato desidrogenase presente no complexo II da mitocôndria do fungo, atuando portanto na cadeia de transporte de elétrons do mesmo (AVENOT et al., 2012).

Segundo dados do FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) algumas espécies de fungos fitopatogênicos já apresentam resistência ao grupo das carboxamidas e, dessa forma, torna-se muito importante a realização do monitoramento constante e de trabalhos que visem estudar e divulgar os resultados

da eficácia de fungicidas, como vem desenvolvendo a EMBRAPA em parceria com diversas instituições de pesquisa, criando uma rede de informações de abrangência nacional denominado Consórcio Antiferrugem (www.consorcioantiferrugem.net) de extrema importância para empresários rurais e para sociedade brasileira.

Apesar de o monitoramento e testes de eficácia em condições de laboratório e campo ser as estratégias mais acuradas para verificação de uma possível resistência de determinada população de fungos a fungicidas, tais metodologias não são capazes de predizerem (mesmo com certo grau de incerteza associado) o momento mais provável de perda de eficácia de uma molécula ou grupo, sendo necessário o desenvolvimento de alternativas que os complementem.

Entre outras alternativas e analisando a grande quantidade de variáveis envolvidas na resistência de fungos a fungicidas, modelos matemáticos configuram-se como possíveis complementos às metodologias já desenvolvidas e praticadas atualmente, permitindo, em alguns casos, antecipar ou mesmo modificar estratégias de manejo com o intuito de proporcionar maior longevidade as moléculas presentes no mercado.

Diante do exposto, o trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um modelo matemático para auxiliar na previsibilidade da evolução de biótipos resistentes do fungo *Phakopsora pachyrhizi* aos fungicidas do grupo químico SDHI, contribuindo para a manutenção de estratégias mais sustentáveis e duradouras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos biológicos de *Phakopsora pachyrhizi*

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* tem sua origem no continente asiático, sendo classificado no filo Basidiomycota. Os primeiros relatos dessa espécie foram encontrados no Japão em 1902 em plantas de *Pachyrhizus erosus* (L.) (KAMEI et al., 1957). No continente americano, os primeiros relatos remetem a década de 90, onde foram encontradas as primeiras evidências do fungo no Hawai (KILGORE et al., 1994) entre os anos de 1997 e 2001. Durante o início dos anos 2000, esporos do fungo se espalharam por toda América do Sul, chegando ao Brasil entre os anos de 2001 e 2003 (FREIRE et al., 2003).

A rápida disseminação das estruturas reprodutivas (uredósporos) que permitem atingir longas distâncias deve-se ao fato dos mesmos serem transportados pelo vento. Além disso, a alta incidência da doença em diversos países está associado a grande amplitude de hospedeiros alternativos do fungo – o patógeno pode esporular em cerca de 42 espécies de 19 gêneros diferentes de plantas da família Fabaceae – o que dificulta o seu controle em campos comerciais de soja (ONO et al., 1992). Os principais hospedeiros estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Nome científico dos principais hospedeiros de *Phakopsora pachyrhizi*

<i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i>
<i>Vicia faba</i>
<i>Lablab purpureus</i>
<i>Phaseolus lunatus</i> var. <i>lunatus</i>
<i>Vigna radiata</i>
<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>
<i>Pachyrhizus ahipa</i> , <i>P. erosus</i>
<i>Vigna unguiculata</i>
<i>Calopogonium mucunoides</i>
<i>Alysicarpus vaginalis</i>
<i>Trifolium incarnatum</i>
<i>Trifolium aureum</i>
<i>Trifolium lappaceum</i>
<i>Trifolium repens</i>
<i>Crotalaria anagyroides</i> , <i>C. spectabilis</i>
<i>Securigera varia</i>
<i>Trigonella foenum-graecum</i>
<i>Desmodium tortuosum</i>
<i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i>
<i>Lespedeza</i> spp., <i>Kummerowia striata</i> , <i>K. stipulaceae</i>
<i>Lupinus</i> spp.
<i>Medicago</i> spp.
<i>Astragalus cicer</i> , <i>A. glycyphyllos</i>
<i>Pisum sativum</i>
<i>Sesbania exaltata</i>
<i>Cajanus cajan</i>
<i>Macroptilium atropurpureum</i>
<i>Glycine max</i>
<i>Canavalia gladiata</i>
<i>Lotus</i> spp.
<i>Vigna mungo</i>
<i>Neonotonia wightii</i>
<i>Vicia villosa</i> subsp. <i>Varia</i>

Fonte: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/SoybeanRustPort.aspx>

O ciclo de *P. pachyrhizi* e de outras ferrugens de forma geral, tende a ser muito complexo, uma vez que envolve ciclo sexuado e assexuado. Para a ferrugem asiática, a reprodução sexuada dá origem a teliósporos ocorrendo, portanto, meiose, onde haverá a formação de quatro basidiósporos haploides que poderão infectar o próprio hospedeiro em que foi originado, ou infectar outro hospedeiro alternativo. Tais estruturas apresentam duas funções: sobrevivência do fungo na ausência de um hospedeiro vivo e promoção da variabilidade genética da espécie. Contudo, tais etapas de desenvolvimento e o estudo da fase sexuada de *P. pachyrhizi* ainda não foram bem esclarecidos. Além disso, teliósporos e basidiósporos não foram verificados com frequência em condições brasileiras, contudo, em algumas regiões da Ásia é possível encontra-los em diversos hospedeiros, porém sem observações de

germinação de tais esporos sexuais em condições naturais, sendo obtidos apenas em condições de laboratório. (BROMFIELD, 1984).

Outro tipo de reprodução denominada anamórfica ou clonal dá origem aos uredósporos, que são esporos dicarióticos que apresentam as mesmas características genéticas da geração anterior. São estruturas binucleadas e unicelulares e configuram-se como a principal forma de infecção e perpetuação da espécie em condições naturais (KOCK; HOPPE, 1987).

Uredósporos são formados assexuadamente e após 5 a 8 dias são liberados pelas urédias (pústulas) através do ostíolo e carregados para outros locais pelo vento até encontrar atingir as folhas de soja ou de outros hospedeiros.

Para que ocorra o processo de infecção, são necessárias entre 6 a 12 horas de molhamento foliar e temperatura entre 8 a 29°C, sendo as condições ótimas variando entre 16 a 28°C (DEL PONTE et al., 2006). Uma vez satisfeitas tais condições, ocorrerá a formação do tubo germinativo que se apresenta de forma globosa em sua extremidade interna, esta estrutura é denominada apressório e é responsável pela penetração das estruturas do fungo no tecido foliar do hospedeiro (GOLLNER et.al., 2010). Ao contrário de outras espécies de ferrugens, onde a infecção ocorre via estômatos, *P. pachyrhizi* pode realizar tais processos penetrando diretamente pela epiderme de tecidos foliares, sem a necessidade da via estomática (GOLLNER et.al., 2010).

Após a ocorrência do processo infeccioso, a formação dos primeiros haustórios poderá ser observada entre 24 e 48 horas após o contato dos uredósporos com o hospedeiro, colonizando rapidamente todo o mesófilo (KOCH et al., 1983). O ciclo assexuado termina quando novas urédias (pústulas) são formadas, o que poderá ser visível entre 5 a 10 dias (GOLLNER et.al., 2010).

Figura 1. Ciclo biológico de *Phakopsora pachyrhizi*
 Fonte: Reis et.al. 2006a

A alta variabilidade genética do patógeno é outro aspecto que merece atenção. Embora haja poucas informações e estudos que elucidem as etapas do ciclo sexuado de *P. pachyrhizi*, este não parece ser o principal fator que explicaria a alta taxa de variabilidade genética em biótipos do fungo, uma vez que tal processo é de difícil ocorrência em condições brasileiras. Dessa forma, a hipótese mais plausível relaciona-se com o ciclo parassexual e heterocariose, conferindo troca de material genético entre núcleos das células sem a necessidade do processo meiótico (VITTAL et al., 2012).

Em estudos realizados com diversos isolados de regiões brasileiras e africanas, FREIRE e OLIVEIRA, 2008 trabalharam com sequenciamento de nucleotídeos do espaço interno transcrito (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal de *P. pachyrhizi*, a fim de verificar a variabilidade genética dos isolados. Dessa forma, analisaram 26 amostras oriundas de diversas regiões do Brasil e 4 regiões do Sul da África. Algumas regiões apresentaram diversidade genética de 80%, sendo que alguns novos ribótipos foram descobertos no presente trabalho, o que revela a alta variação genética em populações do fungo e a necessidade de estratégias efetivas para o controle da doença em campos comerciais.

2.2 Características dos fungicidas sistêmicos utilizados na cultura da soja

Os primeiros relatos da ocorrência da ferrugem asiática da soja em território brasileiro datam a safra de 2002/2003 (YORINORI et al., 2002) e, desde então, o uso de fungicidas na cultura aumentou significativamente em virtude da alta capacidade de redução de produtividade. Dessa forma, diversas alternativas de manejo tiveram que ser adotadas e estudadas a fim de minimizar tais perdas. Entre as estratégias mencionadas, a utilização de fungicidas sistêmicos foram amplamente adotadas e fundamentais para o controle do patógeno.

As principais moléculas fungicidas presentes no mercado são amplamente estudadas pelo FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*), comitê organizado pelas principais empresas desenvolvedoras do setor de defensivos agrícolas e responsáveis por monitorar, estudar e divulgar informações relacionadas a resistência de fungos aos principais grupos químicos de fungicidas (FRAC, 2016).

Segundo este órgão, os principais grupos químicos envolvidos no controle de *Phakopsora pachyrhizi* na cultura da soja são: (i) Inibidores da Demetilação (DMIs); (ii) Inibidores da Quinona oxidase (QoI); (iii) Inibidores da Succinato Desidrogenase (SDHI).

2.2.1 Inibidores da Desmetilação (DMIs)

Os primeiros fungicidas sistêmicos utilizados na cultura da soja para o controle de *P. pachyrhizi* pertencem ao grupo químico dos inibidores de desmetilação (DMI). As moléculas pertencentes a este grupo atuam inibindo a desmetilação catalisada pelo citocromo P-450 (enzima esterol-C14 desmetilase), prejudicando a formação de ergosterol, principal lipídio que compõe a membrana celular de diversas espécies de fungos superiores (Ascomycotas, Basidiomycotas e Fungos Mitospóricos) e que possui como precursor o lanosterol (Figura 1), o que inclui ferrugens de forma geral. É importante ressaltar que os fungicidas pertencentes a esse grupo, não atuam inibindo a germinação de esporos. (RODRIGUES, 2006).

Entre os principais grupos químicos representantes e utilizados no controle de *P. pachyrhizi* estão os triazóis, cuja algumas moléculas são: flutriafol, epoxiconazol, ciproconazol e tebuconazol e triazoliniones, sendo o principal representante o protioconazol.

Tais fungicidas apresentam translocação prioritariamente acropetal e, devido às moléculas apresentarem variações nos níveis de inibição do citocromo P - 450, o grau de eficiência é variável entre os compostos (AMORIM et al., 2011).

A resistência de *P. pachyrhizi* aos fungicidas inibidores da demetilação (DMIs) envolve diversos processos, entre os quais mutações no gene da enzima 14- α -desmetilase que depende do citocromo P450 (CYP51). Klosowsky (2015) citando Schmitz et al. (2014), em estudos realizados com o objetivo de detectar isolados de *P. pachyrhizi* resistentes a DMIs e Qol, constataram que tais mutações poderiam estar situadas em diferentes pontos do gene CYP51, sendo basicamente a alteração de aminoácidos em cinco pontos principais.

2.2.2 Inibidores da Quinona externa (Qol)

Os fungicidas do grupo químico da quinona externa englobam diversas moléculas de ação fungicidas que atuam na respiração mitocondrial de fungos, apresentando ação na ligação ao sítio Qo do complexo do citocromo bc 1 (complexo III), impedindo transferência de elétrons e a síntese de ATP, culminando em deficiência energética e morte do fungo (KLOSOWSKY, 2015).

Entre alguns exemplos dos representantes desse grupo, estão: azoxistrobina e picoxiestrobina – representando o grupo químico metoxi-acrilatos; piraclostrobina (metoxi-carbamatos) e trifloxistrobina (oximino-acetatos) (FRAC, 2016).

Todos esses fungicidas apresentam translocação acropetal e tem ação na germinação de esporos, motivo este que, a partir de sua descoberta, foram amplamente utilizados em combinação com fungicidas DMIs para o controle de *P. pachyrhizi* (AMORIM et al., 2011).

A resistência de *P. pachyrhizi* aos Qol relaciona-se com a substituição de uma glicina por uma alanina na posição 143 do gene do citocromo b (CYTB) que é responsável por gerar altos níveis de resistência (GISI et al., 2002 apud KLOSOWSKY, 2015). Contudo, outras possibilidades de mutações podem ocorrer no gene CYTB, como o F129L e G137R, gerando menores níveis de resistência.

A proteína alvo dos Qol, citocromo bc-1 ubiquinol oxidase, é codificada por um gene mitocondrial e, como os mecanismos de reparo do DNA mitocondrial são

menos efetivos, os genes mitocondriais são mais suscetíveis a mutações (BRENT; HOLLOMON, 2007a).

2.2.2 Inibidores da Succinato Desidrogenase (SDHI)

Recentemente, devido aos problemas crescentes de resistência de *P. pachyrhizi* aos fungicidas pertencentes aos grupos químicos dos DMI e QoI, um grupo químico adicional foi introduzido na cultura da soja, os fungicidas pertencentes ao grupo dos Inibidores da Succinato Desidrogenase (SDHI).

A enzima SDHI desempenha papéis de fundamental importância em dois processos chaves da respiração celular em organismos eucariotos: o ciclo do ácido cítrico e o transporte de elétrons (SIEROTZKI; SCALIETT, 2013).

Os fungicidas representantes dessa classe foram descobertos a mais de 40 anos, sendo os principais representantes a carboxina, muito utilizada em tratamento de semente para o controle de fungos basidiomicetos. Contudo, o primeiro fungicida SDHI com amplo espectro de ação em fitopatógenos foi a molécula de boscalid, lançada em 2003 (SIEROTZKI; SCALIETT, 2013).

Na cultura da soja o uso de fungicidas SDHI, denominados comumente como carboxamidas, é recente, sendo iniciado no ano de 2013. O mecanismo de ação dessas moléculas é a inibição da enzima Succinato desidrogenase (SDH), também conhecido como complexo II da cadeia respiratória da mitocôndria. Dessa forma, tais compostos atuam na cadeia transportadora de elétrons inibindo a formação de ATP para as células fúngicas (KEON et al., 1991).

Além disso, a SDH consiste em quatro subunidades (A, B, C e D) e o sítio de ligação dos fungicidas inibidores dessa enzima (SDHIs) são as subunidades B, C e D, onde estaria o sítio de ligação da ubiquinona (FRAC, 2016). Dessa forma, qualquer mutação nas respectivas subunidades poderia conferir perda de sensibilidade a tais fungicidas.

Até o ano de 2015, não foram relatados problemas de resistência de *Phakopsora pachyrhizi* aos fungicidas SDHIs pelo FRAC, contudo, o comitê lista diversas espécies de fungos resistentes e classifica o nível de risco de resistência como moderado a alto (FRAC, 2013). Dessa forma, o comitê destaca que mais de um local de mutação pode ser verificado para o mesmo patógeno, contudo raramente eles ocorrem ao mesmo tempo. Além disso, diversos trabalhos revelam a alta probabilidade de apresentarem resistência cruzada (SIEROTZKI; SCALIETT, 2013).

Devido à falta de informações sobre os mecanismos de resistência de *P. pachyrhizi* aos fungicidas SDHI, a utilização de modelos matemáticos de simulação poderia contribuir para elucidar possível progresso de perda de sensibilidade em populações do fungo, permitindo a construção de novas estratégias para o manejo da doença.

2.3 Modelos matemáticos

A utilização de modelos matemáticos no campo da ciência é antiga e apresenta as mais diferentes finalidades. Por definição, um modelo matemático é uma simplificação de um problema real que apresentam premissas, oriundo de processos experimentais ou lógicos, a fim de representá-lo e explicá-lo de forma satisfatória, utilizando conceitos matemáticos e de outros campos da ciência. (BENDER, 1978)

Na fitopatologia, diversos são os modelos epidemiológicos que buscam explicar como a população de determinados patógenos se desenvolvem e evoluem ao longo do tempo a partir de variáveis biológicas, geralmente relacionadas ao patógeno e hospedeiro, associando, em muitos casos, variáveis climáticas – temperatura, umidade, período de molhamento, principalmente.

Modelos matemáticos podem ser classificados seguindo diversos critérios, entre os mais importantes estão: a natureza das variáveis e a dependência com a variável tempo.

Segundo a natureza das variáveis, um modelo pode ser definido como determinístico ou estocástico. Quando há uma associação de um valor fixo de entrada para a variável, e dessa forma, não leva em consideração a variabilidade o modelo é dito determinístico. Caso as variáveis apresentem valores aleatórios e que possam ser representados por funções de distribuição de probabilidade associada as mesmas, o modelo é classificado como estocástico (BENDER, 1978). Dessa forma, os modelos estocásticos são muito utilizados para mensurar incertezas nos ramos da ciência.

Com relação a variável tempo, um modelo pode ser classificado como estático não ocorrem alterações significativas em relação a variável tempo ou dinâmicos ocorrem alterações em relação a variável tempo (MURRAY, 2002).

2.4 Modelos epidemiológicos

Modelos epidemiológicos são caracterizados por apresentarem uma plotagem da proporção de uma determinada doença em relação ao tempo. Nesse contexto é possível realizar diversos estudos como análise de crescimento de uma determinada população de fungos fitopatogênicos, previsão de níveis futuros de determinada epidemia e estudo do processo epidêmico (AMORIM et al., 2011). A seguir, estão descritos de forma resumida os principais modelos epidemiológicos utilizados para descrever o progresso das principais doenças que acometem plantas (AMORIM et al., 2011).

2.4.1 Modelo exponencial

Considerado como um dos primeiros modelos desenvolvidos para explicar a variação populacional de um determinado patógeno, esse modelo apesar de ser simples pode ser muito útil para explicar a evolução inicial de uma doença. Esse modelo pode ser descrito como:

$$\frac{dx}{dt} = r_E x \quad (1)$$

em que dx/dt que se refere à variação do aumento da doença (x) em relação a variação do período considerado (t), em outras palavras, corresponde a taxa de crescimento da doença em um período de tempo; r_E corresponde à taxa de reprodução do patógeno que, nesse caso, é constante. Em termos absolutos, a integração da equação 1 resulta em uma função que descreve a população – representada pelo número de indivíduos ou pela proporção de um tecido vegetal infectado – em relação ao tempo

$$x = x_0 \exp(r_E t) \quad (2)$$

Entre as principais limitações do modelo está o fato de o mesmo permitir que a doença se desenvolva indefinidamente, o que, na realidade é impraticável sendo necessário alguns ajustes, como será considerado por outros modelos a seguir.

2.4.2 Modelo logístico

As primeiras considerações relacionadas ao modelo logístico no ramo epidemiológico foi idealizado por Vanderplank (1963) e, atualmente, é o modelo mais utilizado para descrever o progresso de epidemias, por considerar a quantidade de tecido sadio e infectado existente na planta. A equação diferencial do modelo é descrita da seguinte forma

$$\frac{dx}{dt} = r_L x(1 - x) \quad (3)$$

em que r_L se refere à taxa de reprodução ou taxa de aumento específica para o modelo logístico. A expressão $(1 - x)$ é um fator de correção que corresponde a quantidade de tecido sadio. Dessa forma, a taxa de crescimento de uma doença é proporcional a quantidade de doença presente (x) e à quantidade de tecido sadio disponível, representado por $(1 - x)$. A integração da equação 3 representa a quantidade de doença em função do tempo:

$$x = 1 / (1 + \left[\left(\frac{1}{x_0} \right) - 1 \right] \exp(-r_L t)) \quad (4)$$

Graficamente, a equação 4 é representada por um formato em “S” característico, com ponto de inflexão quando $x = 0,5$. Nesse contexto, é possível observar que x é sempre expresso pela proporção da doença e nunca como valor absoluto.

2.4.3 Modelo de Gompertz

Desenvolvido por Benjamin Gompertz no século XIX, o modelo matemático de Gompertz inicialmente foi testado em estudos envolvendo taxa de mortalidade em uma determinada população de seres humanos. Segundo este matemático, a taxa de mortalidade teria um crescimento geométrico, contribuindo para diversos estudos posteriormente.

Na fitopatologia, o modelo de Gompertz é muito empregado, tendo abrangência semelhante ao modelo logístico. A equação diferencial que descreve o crescimento populacional de um determinado patógeno x em função do tempo t pode ser descrita da seguinte forma:

$$\frac{dx}{dt} = r_G x(-\ln(x)) \quad (5)$$

em que r_G é a taxa de reprodução ou taxa específica para o modelo de Gompertz. Analisando a equação 5, verifica-se uma semelhança com o modelo logístico, sendo a plotagem de dx/dt em relação ao tempo apresentando um formato de “S”, contudo, o ponto de inflexão é assimétrico, não ocorrendo com $x = 0,5$ conforme verificado no modelo logístico. A integração da equação 5 resulta em uma função de x em relação a t , expressa na equação 6:

$$x = \exp\{-[\ln(x)] \exp(-r_G t)\} \quad (6)$$

Em termos práticos, o modelo de Gompertz diferencia-se do modelo logístico por apresentar um crescimento mais acentuado no início do desenvolvimento da doença.

2.4.4 Modelo monomolecular

Diferentemente dos modelos anteriores, o modelo monomolecular leva em consideração o inóculo inicial (Q) e a taxa de infecção do patógeno (R). Dessa forma, a equação diferencial que o representa pode ser descrita da seguinte forma:

$$\frac{dx}{dt} = r_M(1 - x) \quad (7)$$

em que r_M representa a taxa de aumento específica para o modelo monomolecular e é dada por $r_M = QR$ e $(1 - x)$ corresponde a proporção de tecido sadio. A integração da equação 7 resulta em:

$$x = 1 - (1 - x_0)\exp(-r_M t) \quad (8)$$

O resultado gráfico da equação 8 é uma curva côncava, representando acréscimos decrescentes em relação a população do patógeno, aproximando-se assintoticamente à medida que o tecido sadio vai exaurindo-se e, conseqüentemente, a quantidade de doença é máxima.

2.5. Modelos preditivos para resistência a fungicidas

Modelos epidemiológicos fornecem predições do desenvolvimento da doença em relação ao tempo. Contudo, para estimar o tempo necessário para que

ocorra o fenômeno de resistência, maiores quantidades de variáveis são envolvidas. Nesse contexto, alguns modelos preditivos podem ser considerados.

2.4.1 Modelo de Milgroom

O modelo desenvolvido por Milgroom (1989) permite quantificar a probabilidade da frequência de um biótipo resistente (q_t) atingir um limiar de resistência em uma população. Dessa forma, quanto maior é tempo para a ocorrência do primeiro indivíduo resistente, menor será a frequência do mesmo em uma dada população inicial (N_0).

A partir do momento em que se define um limiar para q_t , o qual o autor denomina de q^* , é possível calcular o tempo para que ocorra a resistência (x) do patógeno ao fungicida.

As variáveis envolvidas são: tamanho da população (N), taxa de mutação (p) e eficácia do fungicida ($1-\alpha$), onde α representa a pressão de seleção exercida pelo fungicida.

O número de indivíduos resistentes (N_R) tem uma distribuição binomial com parâmetros N e p e pode ser calculado da seguinte forma:

$$P_R\{NR = n\} = \binom{N}{n} p^n (1 - p)^{N-n} \quad n=0,1,2,\dots,n \text{ e } 0 < p < 1 \quad (9)$$

Entre os pressupostos do modelo estão: (i) a mutação é assumida como ocorrendo apenas na formação do inóculo antes da infecção; (ii) cada indivíduo é independente dentro de uma população N ; (iii) indivíduos resistentes podem não ocorrer em uma população, podendo ser originados por uma mutação.

Dessa forma, o modelo de Migroom (1989) é um modelo estocástico capaz de calcular a probabilidade do surgimento de indivíduos resistentes ao longo do tempo e, dessa forma, calcula a frequência dos mesmos dados uma população N . Porém, o modelo não é capaz de realizar uma predição do momento em que ocorre o aparecimento do primeiro indivíduo resistente (x), sendo necessária a atribuição de diversos valores para x a fim de estimar um limiar de resistência (q^*).

2.4.2 Modelo de Skylakakis

O modelo desenvolvido por Skylakakis (1981) aborda a construção de modelos determinísticos considerando duas estratégias de manejo muito comuns, a mistura de diferentes ingredientes ativos e a alternância dos diferentes mecanismos de ação de fungicidas e suas implicações na evolução de resistência de fungos fitopatogênicos.

Para comparar qual a estratégia seria a mais indicada, o autor utiliza-se do conceito de tempo de seleção padrão. Este por sua vez é definido como o tempo necessário para que a proporção de indivíduos resistentes em uma população cresça *e* vezes.

Diante dos pressupostos adotados e do desenvolvimento do modelo, o tempo de seleção padrão é dependente do grau de resistência e da eficiência da mistura de moléculas fungicidas utilizadas. Assim, quanto maior é a eficiência do fungicida e o grau de resistência do fungo ao mesmo, menor o tempo de seleção padrão, ou seja, maior a frequência de organismos resistentes em uma população em curto período de tempo.

No extremo oposto, a adição de um segundo fungicida com elevada eficácia em mistura ao primeiro, também com elevada eficácia, elevaria o tempo de seleção padrão, ou seja, retardaria a evolução da resistência.

O autor conclui que a estratégia de mistura de fungicidas poderia ser otimizada quando a taxa aparente de infecção do patógeno na presença do fungicida é relativamente baixa e o período de latência é curto.

2.5. Incerteza em modelos matemáticos e distribuições de probabilidades utilizadas

Em diversos campos das ciências e da economia, o conceito de incerteza apresenta papel fundamental, uma vez que para quase todos os processos naturais há uma variabilidade associada a determinada variável, a qual não pode ser atribuído um valor pontual. Dessa forma, a adição da variabilidade em modelos determinísticos configura-se como uma alternativa importante para compreender fenômenos e a variabilidade a eles associadas. Nesse contexto, o conceito de incerteza e risco está muito associado, sendo que este é definido como “incerteza mensurável”, ou seja, quando são conhecidas as possibilidades futuras (KNIGHT; CLASSICS, 1964).

Para a mensuração e estudos de variáveis que envolvam incertezas, diversos métodos estatísticos são utilizados, ou seja, há a necessidade de utilização do conhecimento adequado de distribuições de probabilidades e métodos quantitativos para a abordagem do problema envolvido, entre eles, destaca-se o Método de Monte Carlo (MMC), que simplificada, pode ser entendido como um método baseado em amostragens aleatórias realizadas repetidamente e em grande número de vezes, seguindo os parâmetros de uma função de densidade de probabilidade que represente a variável aleatória envolvida (HERRISON, 2010).

As distribuições utilizadas para a confecção dos cenários de incerteza no presente trabalho estão descritas nos tópicos a seguir.

2.5.1 Distribuição uniforme

A distribuição uniforme configura-se como uma distribuição contínua e de grande importância em teoria de probabilidade, uma vez que sua principal característica é considerar que a probabilidade de dado fenômeno de ocorrer é a mesma para fenômenos de mesmo comprimento. Dessa forma, a função densidade de probabilidade $f(x)$ para uma variável aleatória X que apresente distribuição uniforme no intervalo $[a,b]$ é descrita da seguinte forma:

$$f(X = x) = \begin{cases} \frac{1}{b-a} & \text{se } a \leq x \leq b; \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases}$$

O valor esperado $E(X)$ e a variância $Var(X)$ são dados respectivamente por:

$$E(X) = \frac{a+b}{2}$$

e

$$Var(X) = \frac{(b-a)^2}{12}$$

2.5.2 Distribuição beta

A distribuição beta uma distribuição contínua e frequentemente utilizada para a modelagem de taxas e proporções que, em geral, pertencem ao intervalo $[0,1]$.

Além disso, essa distribuição pode apresentar diversas formas, apresentando semelhanças com outras distribuições conhecidas.

A função densidade de probabilidade para uma variável aleatória X é dada por:

$$f(X = x) = \frac{\Gamma(\alpha + \beta)}{\Gamma(\alpha)\Gamma(\beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1}, x \in [0,1] \text{ e } \alpha, \beta > 0$$

Onde α e β são parâmetros da distribuição e definem a forma da mesma, ou seja, caso $\alpha=\beta$ a distribuição é simétrica, se $\alpha>\beta$, a distribuição é assimétrica negativa e no caso de $\alpha<\beta$ é assimétrica positiva.

O valor esperado $E(X)$ e a variância $Var(X)$ são dados por:

$$E(X) = \frac{\alpha}{\alpha + \beta}$$

e

$$Var(X) = \frac{\alpha\beta}{(\alpha + \beta)^2(\alpha + \beta + 1)}$$

2.6. Conceitos de resistência de fungos a fungicidas

A definição de resistência de determinado fungo a uma molécula fungicida é abrangente e envolve diversos fatores. O FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) define como sendo uma redução na sensibilidade adquirida na população de um fungo quando exposta a um agente fungicida, sendo esta característica hereditária (RUSSEL, 2004).

Segundo a instituição, alguns pesquisadores utilizam outros termos como redução de sensibilidade ou tolerância quando há pequena redução da eficiência do fungicida, não apresentando consequências significativas em relação a sua utilização. Já o termo “resistência” é considerado em um contexto em que há significativa perda de eficácia da molécula fungicida, comprometendo sua utilização em condições comerciais (BRENT; HOLLOMON, 2007a).

Em uma população sob equilíbrio gênico e que segue os pressupostos de Hardy e Weinberg (Equilíbrio de Hardy-Weinberg), as frequências dos seus alelos permaneceriam constantes ao longo das gerações, a menos que não atuassem forças evolutivas, tais como: mutação, seleção deriva genética e outras. Dessa forma, em uma população de fungos em que não houvesse a aplicação de compostos

antifúngicos, a frequência dos genes que conferissem resistência a esse determinado composto permaneceria constante (EDWARDS, 2008)

Porém, nessa população haverá indivíduos naturalmente insensíveis ao fungicida, o que o FRAC classifica como indivíduos mutantes e que, de forma geral, apresentam-se em menor frequência em uma determinada população.

Diante desses conceitos, os ensaios de *baseline* são de grande importância para monitorar como determinada população do fungo evolui ao longo do tempo quando submetidos a concentrações crescentes de um determinado composto fungicida. A princípio, monitora-se a população antes do início da utilização das moléculas – também denominada população nativa ou selvagem – verificando sua evolução ao longo dos anos e, posteriormente, são realizados estudos envolvendo técnicas de genética molecular para detectar os *loci* onde ocorreu a mutação (RUSSEL, 2004).

Outro aspecto muito importante está relacionado ao o custo adaptativo. Com o intuito de verificar os efeitos do custo adaptativo de populações sensíveis e mutantes de *Phakopsora pachyrhizi* aos fungicidas inibidores da demetilação (DMI) e inibidores da quinona externa (QoI), Klosowski et al. (2016) concluíram que, para os mutantes insensíveis aos DMIs, representados por mutações ocorridas no gene CYTP51, houve menor adaptabilidade quando comparado a isolados sensíveis. Enquanto que, para os mutantes com menor sensibilidade aos QoI, representados por mutações no gene CYTB, não houveram diferenças significativas em termos adaptativos em relação aos indivíduos selvagens.

Com relação aos tipos de resistência, esses podem ser classificados em dois grandes grupos: quantitativos e qualitativos.

A resistência quantitativa ou contínua é caracterizada por afetar diversos genes, dessa forma os biótipos apresentam uma variação na sensibilidade para o fungicida utilizado. Dessa forma, o contínuo aumento de dose implicaria em ligeiro aumento na eficiência do fungicida, seguindo uma tendência de acréscimos decrescentes, à medida que os indivíduos fossem perdendo sensibilidade.

A resistência qualitativa ou disruptiva caracteriza-se por ser governada por um ou poucos genes. Assim, não se verifica relação dose-resposta para o controle de determinado fungo em relação a um fungicida específico. Essa característica deve-se ao fato de que, há indivíduos mutantes na população de um determinado patógeno que são resistentes, contudo em frequência muito reduzida, sendo a dose necessária

do fungicida para seu controle muito alto quando estes tornarem-se os mais frequentes na população. Dessa forma, não há justificativas plausíveis em termos econômicos e ambientais para aumento de dose do fungicida (DEISING et al., 2008).

2.6.1 Resistência de fungos a fungicidas inibidores de SDHI

A enzima Succinato Desidrogenase (SDH), também denominada Complexo II, é uma enzima localizada na mitocôndria de organismos eucariotos e desempenha funções essenciais na oxidação de succinato a fumarato (componente do Ciclo de Krebs) e da ubiquinona à ubiquinol na cadeia transportadora de elétrons, apresentando função chave no processo de respiração celular (HUANG; MILLAR, 2013).

A SDH em eucariotos é formada por quatro subunidades (A, B, C e D). As subunidades A e B são hidrofílicas e estão emersas na matriz mitocondrial, enquanto as subunidades C e D são de natureza hidrofóbica e estão ancoradas na membrana das cristas mitocondriais (SIEROTZKI; SCALIETT, 2013).

A ilustração esquemática da enzima está representada na Figura 2.

Figura 2. Representação simplificada da enzima SDH e suas subunidades

Fonte: Wikipedia (https://en.wikipedia.org/wiki/File:SDH_complex.jpg)

A sequência de aminoácidos das subunidades A e B apresentam 80% de similaridade entre os organismos eucariotos, contudo, as sequências para as subunidades C e D, regiões de ligação com a ubiquinona, são muito divergentes entre plantas, fungos e mamíferos (HUANG; MILLAR, 2013).

A codificação das cadeias peptídicas que compõem as subunidades do Complexo II são prioritariamente governadas por genes de origem nuclear na maioria dos eucariotos, contudo alguns estudos com o intuito de elucidar a origem e a evolução de tais genes, apresentam evidências de que estes estavam presentes em DNA mitocondrial de procariotos (BURGER et al., 1996).

Trabalhando com *Mycosphaerella graminicola* em trigo, Scalliet et al. (2012) realizaram estudos importantes ao induzir a resistência por meio de radiação UV, onde chegou a identificar cerca de 27 substituições de aminoácidos em 18 posições diferentes nos sítios das subunidades SDHB, SDHC e SDHD que conferiam seletividade distinta para as 5 diferentes carboxamidas testadas. Além disso, os mesmos autores realizaram estudos com intuito de elucidar os efeitos de custo adaptativo para os biótipos mutantes, chegando à conclusão que, em experimentos conduzidos *in vivo* não foram observados efeitos prejudiciais significativos na biologia do patógeno a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) permaneceram muito semelhantes aos níveis observados em biótipos não mutantes -, enquanto que em ensaios *in planta*, houveram impactos significativos no ciclo biológico dos biótipos mutantes, principalmente relacionados à virulência dos mesmos. Além disso, os mesmos autores atentam para a diferença entre a estrutura química dos fungicidas SDHIs em relação à frequência de indivíduos na população e as principais mutações ocorridas.

Entre as três subunidades que compõem o sítio de ligação da ubiquinona (Qp), a SDHB é que se apresenta mais conservada (57% de identidade das sequências de aminoácidos) enquanto as subunidades SDHC e SDHD exibiram 21 e 22% de sequências conservadas de aminoácidos. Além disso, observou-se que de 18 aminoácidos substituídos, 13 afetavam a produção de compostos importantes para o

desempenho da enzima Qp, entre eles alguns que envolviam os sítios de ligação da ubiquinona.

Por fim, os autores identificaram duas regiões nas subunidades SDHB e SDHC mais propensas à mutação, sendo que para SDHB as mutações estariam na substituição dos aminoácidos S218 por P225 e de R265 por N271 R; SDHC entre T79 por V88 e de S83 por V88. Para a subunidade SDHD, a posição D129 foi a única que sofreu substituição.

A sensibilidade de fungos aos novos fungicidas SDHI é muito variável em relação a espécie do patógeno e frequência que um determinado fungicida é utilizado na região de origem. A Tabela 2 abaixo mostra os principais organismos que já apresentam resistência aos fungicidas SDHI.

Tabela 2. Relatos de resistência de fungos a fungicidas SDHI compilados pelo FRAC (2015)

Espécie do fungo	Hospedeiro	Origem da resistência	Local da Mutação (subunidade - mutação)
<i>Ustilago maydis</i>	Laboratório	Laboratório	B-H257L
<i>Aspergillus oryzae</i>	Laboratório	Laboratório	B-H249Y/L/N, C-T90I, D-D124E
<i>Zymoseptoria tritici</i>	Laboratório	Laboratório	B-N225I, B-H267Y/R/L, B-I269V, C-A84V, C-H152R, C-T79I, C-N86K, C-G90R, D-H129E, outras
<i>Zymoseptoria tritici</i>	Trigo	Campo	B-N225T, C-T79N, C-W80S, C-N86S
<i>Pyrenosphora teres</i>	Cevada	Campo	B-H277Y, C-N75S, C-G79R, C-H134R, C-S135R, D-D124N/E, D-H134R, D-D145G
<i>Botrytis cinerea</i>	Várias culturas	Campo	B-P225L/T/F, B-H272Y/L/R/V, B-N230I, D-H132R, C-A85V
<i>Botrytis cinerea</i>	Lírio	Campo	B-H272Y/R
<i>Alternaria alternata</i>	Pistache	Campo	B-H277Y/R, C-H134R, D-D123E, D-H133R
<i>Alternaria solani</i>	Batata	Campo	B-H277Y/R, D-H133R
<i>Corynespora cassiicola</i>	Cucurbitáceas	Campo	B-H278Y/R, C-S73P, D-S89P, D-G109V
<i>Didymella bryoniae</i>	Cucurbitáceas	Campo	B-H277R/Y
<i>Podosphaera xanthii</i>	Cucurbitáceas	Campo	B-H-> (homólogo a H272 em <i>B.cinerea</i>)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Colza	Campo	B-H273Y, C-H146R, D-H132R
<i>Stemphylium versicarium</i>	Aspargo	Campo	B-P225L, H-272Y/R
<i>Venturia inaequalis</i>	Maçã	Campo	C-H151Y/R

Fonte: Adaptado de FRAC 2015 (www.frac.info)

Conforme ilustra a Tabela 2, com informações compiladas pelo FRAC até o ano de 2014, é possível verificar que ainda não houve relatos de resistência de *Phakopsora pachyrhizi*, contudo, verifica-se uma grande quantidade de organismos

que já apresentam resistência a tais moléculas. Outro fator importante relaciona-se às subunidades onde ocorreram as mutações; observa-se que as maiores frequências de mutação ocorreram nas subunidades SDHB e SDHC, quando comparadas a SDHD.

Não há relatos em trabalhos científicos que constatarem mutações em mais de uma subunidade para um mesmo indivíduo, como exemplificado no trabalho de Scalliet et al. (2012).

2.6.1.1 Características biológicas de mutantes resistentes a fungicidas SDHI

As subunidades B e C apresentam maior frequência de indivíduos mutantes, conforme trabalhos compilados pelo FRAC. Trabalhando com isolados de *Mycosphaerella graminicola* e diversos fungicidas, Fraaije et al. (2012) relataram uma gama de mutações nas três subunidades (B, C e D), sendo que a mutação ocorrida na SDHB-H267L conferiu alto nível de resistência as moléculas de carboxin, boscalid, bixafen e isopyrazam, todas representantes da classe de fungicidas SDHI, o que sugere a possibilidade de ocorrer resistência cruzada.

Além disso, os autores evidenciaram frequências mais elevadas de indivíduos mutantes para subunidade SDHB, seguida de SDHC e, em menor frequência, SDHD. Os mesmos autores mostraram que, em relação ao custo adaptativo, os mutantes apresentaram menor atividade da enzima SDH, variando entre 18% para os mutantes B-H267 L e 56% para os mutantes D-D129E, o que foi evidenciado em menor produção de esporos.

Devido à alta quantidade de códons alterados em biótipos mutantes, nas mais variadas espécies de fungos, o FRAC classifica o risco de resistência a SDHIs entre médio a alto. Com o objetivo de entender o processo de resistência de *Corynespora cassiicola* a boscalid, Miyamoto et al. (2010) sequenciaram genes que codificavam as subunidades da enzima succinato desidrogenase obtidas de 56 isolados provenientes de 24 áreas comerciais de produção de pepino (*Cucumis sativus*), classificando as estirpes resistentes em três níveis: muito alta (VHR), alta (HR) e moderada (MR), conforme os controles obtidos pela EC₅₀. Os mutantes representantes da classe VHR e HR apresentaram alterações em B-H278Y e B-H278R, respectivamente. Os representantes de MR sofreram substituições nas

subunidades SDHC (uma substituição de aminoácido) e SDHD (duas substituições de aminoácidos), sendo estas respectivamente C-S73P, D-S89P e D-G109V.

Seguindo o mesmo raciocínio com oídio (*Podosphaera xanthii*) em pepino, Myamoto (2010) verificou que isolados altamente resistentes e resistentes apresentavam alterações na SDHB, culminando em queda significativa na eficácia da molécula de boscalid.

Entre os principais trabalhos que quantificam a frequência de indivíduos mutantes a fungicidas SDHI em uma população de *Mycosphaerella graminicola* induzida por radiação ultravioleta (UV), Scalliet et al. (2012) constataram que as maiores frequências de mutação estavam nas subunidades B, seguidas pelas subunidades C e D, respectivamente. Além disso, as frequências de isolados mutantes variaram entre fungicidas na ordem de 10^{-6} a 10^{-8} , apresentando penalidades adaptativas em relação a atividade da enzima SDH, para a maioria dos isolados, sendo os valores médios da atividade da enzima SDH para mutantes de SDHB, SDHC e SDHD de 29, 41 e 16%, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A falta de informações referentes a casos de resistência de *Phakopsora pachyrhizi* aos novos fungicidas SDHI na cultura da soja faz com que haja diversas pressuposições quanto às possibilidades que tal patógeno possa assumir quando submetido à utilização de tais moléculas.

Nesse contexto, foi elaborado um modelo determinístico para previsão do tempo de resistência e, posteriormente, incorporado o componente de incerteza a esse modelo, o que permitiu o tratamento de algumas variáveis de forma estocástica.

Para a confecção dos cenários estocásticos, foi desenvolvido um algoritmo em linguagem R (R CORE TEAM, 2015) e empregado o método de Monte Carlo para as variáveis de interesse que integram o modelo determinístico.

3.1 Modelo determinístico

3.1.1 Pressuposições do modelo

Para a elaboração do modelo algumas pressuposições foram assumidas:

- i. A população de *Phakopsora pachyrhizi* segue o equilíbrio de Hardy-Weinberg (1908), contudo, as principais forças consideradas que alteram o equilíbrio são: a mutação e a seleção artificial, esta última proporcionada pela utilização de fungicidas SDHI;
- ii. Os indivíduos da população são haploides e apresentam três diferentes genótipos: indivíduos suscetíveis (S), moderadamente resistentes (MR) e resistentes (R);
- iii. Indivíduos suscetíveis (S) podem dar a esporos de indivíduos suscetíveis (S), moderadamente resistentes (MR) ou resistentes (R) com diferentes probabilidades. Esse fenômeno só é possível em virtude da alta taxa de mutação, inerente a espécie, e do ciclo parassexual, o que confere certo nível de variabilidade genética à população;
- iv. Indivíduos resistentes (R) originam somente indivíduos resistentes. Dessa forma, a resistência de indivíduos é uma característica dominante;

- v. Indivíduos moderadamente resistentes (MR) podem originar indivíduos moderadamente resistentes, suscetíveis ou resistentes (R), contudo com diferentes probabilidades;
- vi. A taxa de crescimentos dentro de um ciclo de cultivo da soja segue o modelo epidemiológico exponencial. Tal pressuposto é assumido em virtude da utilização de fungicidas não permitirem que a evolução da doença cause danos tão severos a ponto de os indivíduos competirem entre si por tecidos foliares (não atingem a capacidade suporte), não justificando, por tanto, a utilização do modelo logístico;
- vii. Após o término do ciclo da cultura (soja), a população de indivíduos suscetíveis (S), moderadamente resistentes (MR) e resistentes (R) apresenta um declínio em virtude de situações de adversidades ambientais, como por exemplo, situações de temperaturas muito elevadas e a falta de hospedeiros alternativos; e
- viii. Considera-se que há apenas um único ciclo de cultivo de soja por ano agrícola (safra), não sendo considerado, portanto, cultivos de segunda safra, uma vez que tal prática é restrita em condições brasileiras e limita-se a produção sementes, na maioria dos casos.

3.1.2 Crescimento populacional e Frequência gênica na ausência de forças evolutivas

Uma população N de indivíduos de *Phakopsora pachyrhizi* em dado período inicial $t=0$, em que ainda não houve a utilização de fungicidas SDHIs, é composta por indivíduos S, MR e R em diferentes frequências:

$$\begin{aligned}
 MR_{(t=0)} &= \text{Freq}_{iMR} \cdot N_{(t=0)} \\
 R_{(t=0)} &= \text{Freq}_{iR} \cdot N_{(t=0)} \\
 S_{(t=0)} &= [1 - (\text{Freq}_{iMR} + \text{Freq}_{iR})] \cdot N_{(t=0)} \\
 N_{(t=0)} &= MR_{(t=0)} + R_{(t=0)} + S_{(t=0)}
 \end{aligned}
 \tag{10}$$

em que $N_{(t=0)}$ se refere ao número de indivíduos totais iniciais (antes da utilização de fungicidas); $MR_{(t=0)}$ ao número de indivíduos MR iniciais; $R_{(t=0)}$: número de indivíduos R

iniciais; $S_{(t=0)}$ ao número de indivíduos S iniciais; $Freq_{iMR}$ à frequência alélica inicial de indivíduos MR; e $Freq_{iR}$ à frequência alélica inicial de indivíduos R.

Seguindo os pressupostos, a taxa de crescimento para os indivíduos em cada geração segue um crescimento exponencial na ausência de seleção e mutação, contudo poderá ser considerado uma taxa de mortalidade que pode estar relacionada com a viabilidade dos esporos para cada categoria de indivíduos:

$$\frac{dS}{dt} = [r_S (1 - ms)]S, \text{ para } t \in \mathbb{R} + \quad (11)$$

$$\frac{dMR}{dt} = [r_S (1 - mmr)]MR, \text{ para } t \in \mathbb{R} + \quad (12)$$

$$\frac{dR}{dt} = [r_S (1 - mr)]R, \text{ para } t \in \mathbb{R} + \quad (13)$$

Em que $\frac{dS}{dt}$ se refere à taxa de variação de S em um período t; $\frac{dMR}{dt}$ à taxa de variação de MR em um período t; $\frac{dR}{dt}$ à taxa de variação de R em um período t; r_S ao número de esporos ou pústulas produzidas por indivíduos S em um período t; ms à taxa de mortalidade de indivíduos S em um período t, expressa em porcentagem; mmr à taxa de mortalidade de indivíduos MR em um período t, expressa em porcentagem; e mr à taxa de mortalidade de indivíduos R em um período t, expressa em porcentagem.

Uma observação importante das equações 11, 12 e 13 relaciona-se com as taxas de mortalidades dos indivíduos (ms , mmr e mr). Dessa forma, é possível considerar diferentes taxas de mortalidade para cada uma das classes que compõem a população N, ou seja, é considerado o conceito de *fitness penalty* ou custo adaptativo em relação a quantidade de esporos produzidos por um indivíduo suscetível, possibilitando a simulação de cenários diversos e o impacto final no tempo para resistência.

A frequência dos novos indivíduos para um período t, é dada por:

$$FreqS_{(t)} = S_{(t)} / N_{(t)} \quad , \text{ para } t \in \mathbb{R} + \quad (14)$$

$$FreqMR_{(t)} = MR_{(t)} / N_{(t)} \quad , \text{ para } t \in \mathbb{R} + \quad (15)$$

$$FreqR_{(t)} = R_{(t)} / N_{(t)} \quad , \text{ para } t \in \mathbb{R} + \quad (16)$$

em que $FreqS_{(t)}$ se refere à frequência alélica de indivíduos S em um dado período t; $FreqMR_{(t)}$ à frequência alélica de indivíduos MR em um dado um período t; e $FreqR_{(t)}$ à frequência alélica de indivíduos R em um dado um período t.

As equações 14,15 e 16 revelam que, caso não haja diferenças nas taxas de reprodução dos diferentes indivíduos, as frequências alélicas dos mesmos permanecem constantes ao longo do tempo, corroborando com os princípios do teorema de Hardy-Weinberg, uma vez que, nestes casos não houveram atuação de forças evolutivas.

3.1.3 Relação entre período cronológico e período biológico

Para verificar a evolução da população do fungo ao longo das gerações torna-se necessário relacionar o período cronológico – como por exemplo, o ciclo do genótipo de soja que se deseja – com períodos biológicos relacionados ao ciclo biológico do patógeno, dessa forma, de posse de informações referentes ao ciclo de vida do fungo e do cultivar envolvido, é possível calcular o número de gerações do patógeno por ciclo agrícola da cultura, também denominado ano safra:

$$Nger.safra = [(Cc - t_{inst}) / C_p] \cdot N_s \quad (17)$$

em que $Nger.safra$ se refere ao número de geração do patógeno ao longo de um ano safra, expresso em dias; Cc indica a duração do período do ciclo biológico do genótipo de soja utilizado, expresso em dias; t_{inst} indica o período em que foram observados os primeiros sintomas da doença no ciclo biológico do genótipo utilizado, expresso em dias; C_p indica o período do ciclo biológico do patógeno para dar origem a uma nova geração, expresso em dias; e N_s se refere ao número de ciclos agrícolas (safra) desejados para simulação.

Diante da equação 17, é possível definir a variável independente t como sendo o período entre as gerações do patógeno. Nesse caso, cada geração corresponde, em termos cronológicos, ao período médio do ciclo biológico do patógeno (C_p).

3.1.4 Inserção de forças evolutivas e dinâmica populacional

Conforme mencionado em tópicos anteriores, a dinâmica populacional dos fungos será afetada com a adição de forças evolutivas ao modelo, entre as quais estão: mutação e seleção. Outro aspecto importante, diz respeito às pressuposições apresentadas nos tópicos iii, iv e v, que consideram a forma como ocorrem tal dinâmica entre os indivíduos.

Dessa forma, foram adicionados parâmetros nas equações 11, 12 e 13, originando o sistema de equações diferenciais a seguir que simula a dinâmica das classes de indivíduos em relação a um determinado número de gerações ao longo do número de safras desejados:

$$\frac{dS}{dt} = [r_S(1 - ms)S \gamma_{S,S}](1 - \alpha_S) + (\gamma_{MR,S} MR) \quad (18)$$

$$\frac{dMR}{dt} = [r_S(1 - mmr)MR \gamma_{MR,MR}](1 - \alpha_{MR}) + (\gamma_{S,MR} S) \quad (19)$$

$$\frac{dR}{dt} = [r_S(1 - mr)R] + (\gamma_{S,R} S) + (\gamma_{MR,R} MR)$$

$$\begin{aligned} \text{Para indivíduos S: } \gamma_{S,S} + \gamma_{S,MR} + \gamma_{S,R} &= 1 \\ \gamma_{S,S} &= 1 - (\gamma_{S,MR} + \gamma_{S,R}) \end{aligned} \quad (21)$$

$$\begin{aligned} \text{Para indivíduos MR: } \gamma_{MR,MR} + \gamma_{MR,S} + \gamma_{MR,R} &= 1 \\ \gamma_{MR,MR} &= 1 - (\gamma_{MR,S} + \gamma_{MR,R}), \end{aligned} \quad (22)$$

$$t = 1, 2, \dots, N_{ger.safra}$$

em que $\gamma_{S,S}$ se refere à a frequência de geração de indivíduos S por outros indivíduos S; $\gamma_{MR,S}$ à frequência de mutação de indivíduos MR para S; $\gamma_{MR,MR}$ à frequência de geração de indivíduos MR por outros indivíduos MR; $\gamma_{S,MR}$ à frequência de mutação de indivíduos S para MR; $\gamma_{S,R}$ à frequência de mutação de indivíduos S para R; $\gamma_{MR,R}$ à frequência de mutação de indivíduos MR para R; α_S à eficiência inicial do fungicida para indivíduos S, em porcentagem; e α_{MR} à eficiência inicial do fungicida para indivíduos MR, em porcentagem.

O sistema de equações diferenciais representados pelas equações 18 a 22 ilustram a adição das forças de evolução ao modelo determinístico. Contudo, em situações reais, a utilização de fungicidas não ocorre a todo o momento, nesse caso é possível definir a periodicidade de aplicação de fungicidas em relação a variável t , podendo definir o número de aplicações desejadas em um ano agrícola (N_{aplic}), definindo o valor de $\alpha=0$ para um período t_i em que o fungicida não for aplicado.

Outra questão importante relacionada ao conceito de custo adaptativo refere-se à sobrevivência do patógeno após o término do ciclo agrícola, ou seja, devido a *Phakopsora pachyrhizi* ser um fungo biotrófico, necessitaria de hospedeiros alternativos para dar continuidade ao seu ciclo.

Nesse caso, a ausência de hospedeiros e as condições climáticas adversas ao final do ciclo de cultivo da soja, poderiam ocasionar a morte dos diferentes genótipos do fungo de diferentes formas, conforme evidencia as equações 23, 24 e 25 a seguir:

$$S_{(t=N_{ger.safra*})} = S_{(t=N_{ger.safra*}-1)} \lambda_s \quad (23)$$

$$MR_{(t=N_{ger.safra*})} = MR_{(t=N_{ger.safra*}-1)} \lambda_{mr} \quad (24)$$

$$R_{(t=N_{ger.safra*})} = R_{(t=N_{ger.safra*}-1)} \lambda_r \quad (25)$$

em que $N_{ger.safra*}$ é calculado pela equação 17 para $N_s = 1$; λ_s se refere à taxa de sobrevivência para indivíduos S ($0 \leq \lambda_s \leq 1$); λ_{mr} à taxa de sobrevivência para indivíduos MR ($0 \leq \lambda_{mr} \leq 1$); e λ_r à taxa de sobrevivência para indivíduos R ($0 \leq \lambda_r \leq 1$).

As equações 23 a 25 permitem considerar diferentes taxas de sobrevivências para cada genótipo, assim, é inserido mais um parâmetro que compõe o custo adaptativo.

As frequências dos indivíduos S, MR e R para um período $t = 1, 2, \dots, N_{ger.safra}$, são calculadas pelas equações 14, 15 e 16, respectivamente.

3.1.5 Período inicial de resistência

Para o cálculo do número de gerações em que teve início o processo de resistência parcial (RP), considera-se o primeiro valor de t , denominado t_{RP} , em que $\text{FreqS}(t) \leq \text{FreqMR}(t)$.

De forma análoga para o processo de resistência (RT), o primeiro valor de t , denominado t_{AR} refere-se ao o valor considerado quando $\text{FreqS}(t) \leq \text{FreqR}(t)$.

Dessa forma, é possível calcular o tempo em anos-safras para ambos os processos, da seguinte forma:

$$\text{Para } t_{RP}, \quad T_{aRP} = (Ns \ t_{RP}) \text{ Nger. safra}^{-1} \quad (26)$$

$$\text{Para } t_{AR}, \quad T_{aAR} = (Ns \ t_{AR}) \text{ Nger. safra}^{-1} \quad (27)$$

em que T_{aRP} se refere ao período, em anos, quando $\text{FreqS}(t) \leq \text{FreqMR}(t)$; e T_{aAR} : ao período, em anos, quando $\text{FreqS}(t) \leq \text{FreqR}(t)$.

A partir de T_{aRP} ou T_{aAR} , haverá predominância dos indivíduos MR ou R em relação a S, o que confere indícios de perda de sensibilidade do fungo *Phakopsora pachyrhizi* aos fungicidas SDHI utilizados.

3.1.4 Simulação de cenários para forças evolutivas e estimativa de T_{aRP} e T_{aAR}

Para estimar as variáveis T_{aRP} e T_{aAR} , foi necessário realizar um compilado de informações disponíveis na literatura com o intuito de encontrar parâmetros e índices técnicos que pudessem ser utilizados para as variáveis de entrada do modelo. Contudo, alguns dados foram obtidos de outras espécies de fungos. Tal fato se deve pela ausência de informações efetivas relacionadas a *Phakopsora pachyrhizi* para algumas variáveis.

Dessa forma, alguns cenários foram elaborados (tabela 3), considerando as principais forças evolutivas, para o cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} .

Tabela 3. Cenários (C) e valores das principais variáveis consideradas no modelo

C	Descrição	Variáveis e valores			
C.I	Estimativa de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes números de aplicações de fungicidas ($Naplic$)	$Freq_{IMR}^* = 10^{-5}$	$\gamma_{MR,R}^* = 10^{-6}$	$\alpha_S^4 = 0,9$	$N = 1$
		$Freq_{IR}^2 = 10^{-7}$	$ms^2 = 20$	$\alpha_{MR}^4 = 0,6$	$N_S = 50$
		$\gamma_{S,MR}^* = 10^{-5}$	$mmr^2 = 20$	$\lambda_S = 0,5$	$Cc = 120$
		$\gamma_{S,R}^3 = 10^{-6}$	$mr^2 = 20$	$\lambda_{mr} = 0,5$	$tinst = 60$
		$\gamma_{MR,S}^* = 10^{-6}$	$rs^3 = 10^4$	$\lambda_r = 0,5$	$Cp^1 = 10$
C.II	Estimativa de T_{aRP} para diferentes $Freq_{IMR}$	$Freq_{IR}^2 = 10^{-7}$	$ms^2 = 20$	$\alpha_{MR}^4 = 0,6$	$N_S = 50$
		$\gamma_{S,MR}^* = 10^{-5}$	$mmr^2 = 20$	$\lambda_S = 0,5$	$Cc = 120$
		$\gamma_{S,R}^3 = 10^{-6}$	$mr^2 = 20$	$\lambda_{mr} = 0,5$	$tinst = 60$
		$\gamma_{MR,S}^* = 10^{-6}$	$rs^3 = 10^4$	$\lambda_r = 0,5$	$Cp^1 = 10$
		$\gamma_{MR,R}^* = 10^{-6}$	$\alpha_S^4 = 0,9$	$N = 1$	$Naplic = 2$
C.III	Estimativa de T_{aAR} para diferentes $Freq_{IR}$	$Freq_{IMR}^* = 10^{-5}$	$ms^2 = 20$	$\alpha_{MR}^4 = 0,6$	$N_S = 50$
		$Freq_{IR}^2 = 10^{-7}$	$mmr^2 = 20$	$\lambda_S = 0,5$	$Cc = 120$
		$\gamma_{S,MR}^* = 10^{-5}$	$mr^2 = 20$	$\lambda_{mr} = 0,5$	$tinst = 60$
		$\gamma_{S,R}^3 = 10^{-6}$	$rs^3 = 10^4$	$\lambda_r = 0,5$	$Cp^1 = 10$
		$\gamma_{MR,S}^* = 10^{-6}$	$\alpha_S^4 = 0,9$	$N = 1$	$Naplic = 2$
C.IV	Estimativa de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes $\gamma_{S,R}$ e $\gamma_{MR,R}$	$Freq_{IMR}^1 = 10^{-5}$	$mmr^2 = 20$	$\lambda_S = 0,5$	$Cc = 120$
		$Freq_{IR}^2 = 10^{-7}$	$mr^2 = 20$	$\lambda_{mr} = 0,5$	$tinst = 60$
		$\gamma_{S,MR}^1 = 10^{-5}$	$rs^3 = 10^4$	$\lambda_r = 0,5$	$Cp = 10$
		$\gamma_{MR,S}^1 = 10^{-6}$	$\alpha_S^4 = 0,9$	$N = 1$	$Naplic = 2$
		$ms^2 = 20$	$\alpha_{MR}^4 = 0,6$	$N_S = 50$	
C.V	Estimativa de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes α_S e α_{MR}	$Freq_{IMR}^1 = 10^{-5}$	$\gamma_{MR,R}^1 = 10^{-6}$	$\lambda_S = 0,5$	$Cc = 120$
		$Freq_{IR}^2 = 10^{-7}$	$ms^2 = 20$	$\lambda_{mr} = 0,5$	$tinst = 60$
		$\gamma_{S,MR}^1 = 10^{-5}$	$mmr^2 = 20$	$\lambda_r = 0,5$	$Cp = 10$
		$\gamma_{S,R}^3 = 10^{-6}$	$mr^2 = 20$	$N = 1$	$Naplic = 2$
		$\gamma_{MR,S}^1 = 10^{-6}$	$rs^3 = 10^4$	$N_S = 50$	
C.VI	Estimativa de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes mr e mmr	$Freq_{IMR}^1 = 10^{-5}$	$\gamma_{MR,R}^1 = 10^{-6}$	$\lambda_{mr} = 0,5$	$tinst = 60$
		$Freq_{IR}^2 = 10^{-7}$	$rs^3 = 10^4$	$\lambda_r = 0,5$	$Cp = 10$
		$\gamma_{S,MR}^1 = 10^{-5}$	$\alpha_S^4 = 0,9$	$N = 1$	$Naplic = 2$
		$\gamma_{S,R}^3 = 10^{-6}$	$\alpha_{MR}^4 = 0,6$	$N_S = 50$	
		$\gamma_{MR,S}^1 = 10^{-6}$	$\lambda_S = 0,5$	$Cc = 120$	
C.VII	Estimativa de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes λ_r e λ_{mr}	$Freq_{IMR}^1 = 10^{-5}$	$\gamma_{MR,R}^1 = 10^{-6}$	$\alpha_S^4 = 0,9$	$Cc = 120$
		$Freq_{IR}^2 = 10^{-7}$	$ms^2 = 20$	$\alpha_{MR}^4 = 0,6$	$tinst = 60$
		$\gamma_{S,MR}^1 = 10^{-5}$	$mmr^2 = 20$	$N = 1$	$Cp = 10$
		$\gamma_{S,R}^3 = 10^{-6}$	$mr^2 = 20$	$N_S = 50$	$Naplic = 2$
		$\gamma_{MR,S}^1 = 10^{-6}$	$rs^3 = 10^4$		

¹ Obtido pela opinião de especialistas.² Scalliet *et al.* (2012).³ Danelli e Reis (2016).⁴ Miyamoto *et al.* (2010).

Para facilitar os cálculos das estimativas de T_{aRP} e T_{aAR} , foi desenvolvido um algoritmo implementado em linguagem R.

Conforme já mencionado, a falta de informações significativas relacionadas a diversas variáveis, bem como a variabilidade das mesmas, torna necessário a implementação de incertezas ao modelo determinístico desenvolvido, permitindo a inclusão de componentes de incerteza no modelo, com a finalidade de minimizar possíveis erros do modelo determinístico.

3.1 Modelo determinístico e análise de incerteza

A falta de informações específicas envolvendo a nova geração de fungicidas SDHI e a alta variabilidade de certas variáveis utilizadas no modelo determinístico, fez com que fosse necessária a incorporação de incertezas ao modelo determinístico proposto.

A quantificação de incerteza de um ou mais parâmetros empregados em um modelo determinístico, pode ser realizada de dois modos: utilizando a opinião de especialistas ou pela análise de dados (MAIA, 2003).

A análise de dados pode ser mesclada com a opinião de especialistas, gerando maior confiabilidade nas informações. Nesse contexto, utilizam-se as informações presentes em trabalhos científicos combinados a experiência de pesquisadores, o que permite a geração de distribuições de probabilidades.

Diante do exposto, foram estabelecidas à algumas variáveis relacionadas a biologia do patógeno, distribuições de probabilidade, possibilitando a confecção de novos cenários (tabela 4) com a inclusão da incerteza ao modelo.

É importante salientar que não há informações compiladas em relação a distribuições das variáveis consideradas na tabela 5 para o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, nesse contexto, foram utilizadas informações contidas no FRAC (BRENT; HOLLOMON, 2007) e a opinião de especialistas quanto aos valores considerados.

Tabela 4. Distribuições de Probabilidade e Cenários considerando incertezas para as principais variáveis

Cenário	Freq _{IR}	Freq _{IMR}	$\gamma_{S,R}$	$\gamma_{S,MR}$	$\gamma_{MR,S}$	$\gamma_{MR,R}$	Hipótese considerada
C1	Uniforme ($a=10^{-12}, b=10^{-3}$)	Uniforme ($a=10^{-8}, b=10^{-3}$)	Uniforme ($a=10^{-8}, b=10^{-4}$)	Uniforme ($a=10^{-7}, b=10^{-4}$)	Uniforme ($a=10^{-12}, b=10^{-6}$)	Uniforme ($a=10^{-7}, b=10^{-4}$)	Probabilidades iguais de ocorrência dos valores das variáveis aleatórias (v.a)
C2	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	Cenário demonstrando assimetria positiva, ou seja, baixas taxas de mutações e frequências iniciais
C3	Beta truncada ($\alpha=0,6$ e $\beta=0,4$)	Beta truncada ($\alpha=0,6$ e $\beta=0,4$)	Beta truncada ($\alpha=0,6$ e $\beta=0,4$)	Beta truncada ($\alpha=0,6$ e $\beta=0,4$)	Beta truncada ($\alpha=0,6$ e $\beta=0,4$)	Beta truncada ($\alpha=0,6$ e $\beta=0,4$)	Cenário demonstrando assimetria negativa, ou seja, altas taxas de mutações e frequências iniciais

Tabela 5. Intervalo considerado para as variáveis no truncamento da distribuição beta

Variável	Intervalo
Freq_{iR}	$[10^{-12}, 10^{-3}]$
Freq_{iMR}	$[10^{-8}, 10^{-3}]$
$\gamma_{S,R}$	$[10^{-8}, 10^{-4}]$
$\gamma_{S,MR}$	$[10^{-7}, 10^{-4}]$
$\gamma_{MR,S}$	$[10^{-12}, 10^{-6}]$
$\gamma_{MR,R}$	$[10^{-7}, 10^{-4}]$

Para as demais variáveis do modelo, foram atribuídos os seguintes valores especificados na tabela X a seguir:

Tabela 6. Valores atribuídos para as demais variáveis não consideradas na análise de incerteza

Variáveis	Valores
ms	20
mmr	20
mr	20
rs	10^4
α_s	0,9
α_{MR}	0,6
λ_s	0,5
λ_{mr}	0,5
λ_r	0,5
N	1
N_s	50
Cc	120
tinst	60
Cp	10
N_{aplic}	2

Observa-se, dessa forma, que em virtude do não conhecimento do custo adaptativo de fungicidas SDHIs, para as variáveis que compõem tais parâmetros, foram atribuídos os mesmos valores para todos os genótipos considerados, ou seja, $ms = mmr = mr$ e $\lambda_s = \lambda_{mr} = \lambda_r$.

Para simular os cenários propostos na tabela 6, foi implementado um algoritmo em linguagem R e utilizado o método de simulação de Monte Carlo para $n=1000$ possibilitando a estimativa de $E(T_{aRP})$ e $E(T_{aAR})$, bem como $Var(T_{aRP})$ e $Var(T_{aAR})$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de Cenários – Modelo Determinístico

Os resultados dos cálculos para a estimativa de T_{aRP} e T_{aAR} podem ser verificados a seguir.

4.1.1 CI: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes números de aplicações de fungicidas (N_{aplic})

Os resultados apresentados na tabela 7 referem-se as estimativas de T_{aRP} e T_{aAR} considerando o número médio de aplicação de fungicidas (N_{aplic}).

Tabela 7. Influência do número médio de aplicações de fungicidas (N_{aplic}) no tempo de resistência (T_{aRP} e T_{aAR})

N_{aplic}	T_{aRP}	T_{aAR}
0	> 50	> 50
1	> 50	> 50
2	6,6	5,6
3	3,5	2,8
6	1,5	1,3

Os resultados da tabela 7 evidenciam a influência do número de aplicações dos fungicidas (N_{aplic}) no cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} . Para uma simulação de 50 anos safra ($N=50$) com cultivo de soja realizado apenas uma vez ao ano, o tempo estimado para a ocorrência de resistência parcial (T_{aRP}) e total (T_{aAR}) variou de forma significativa com o aumento do número de aplicações, sendo que, quando $N_{aplic} = 0$ ou $N_{aplic} = 1$, ambas as variáveis apresentaram valores superiores a 50 anos, enquanto que para $N_{aplic} > 2$ os resultados de T_{aRP} e T_{aAR} foram inferiores a 6,6 anos.

Diante disso, nota-se a importância em limitar o número de aplicações de fungicidas para proporcionar maior longevidade a molécula, como sugere FRAC ao recomendar 2 aplicações máximas para os fungicidas SDHI, sendo que estas moléculas apresentam um alto risco de resistência segundo a classificação do comitê (FRAC, 2007).

Ao trabalhar com *Corynespora cassiicola* em pepino (*Cucumis sativum*) Miyamoto et al.(2010) apresenta informações entre o número de aplicações médias de produtos comerciais contendo *boscalid* e a frequência de isolados que

apresentavam-se resistentes ao mesmo, obtidos de casas de vegetação de diversas localidades do Japão. Pelas informações, é possível estabelecer uma correlação positiva entre a frequência de aplicações e a frequência de isolados resistentes, para a maioria dos dados apresentados.

Outro aspecto que merece atenção é que, para todos os cenários propostos verifica-se que $T_{aRP} < T_{aAr}$, indicando que, nas condições propostas, a perda de sensibilidade seria total caso a resistência ocorresse, não apresentando uma etapa de perda de sensibilidade do produto, representado pela maior frequência de biótipos MR em relação a S, etapa esta que ocorreria posteriormente a ocorrência de $\text{FreqR}_{(t)} > \text{FreqS}_{(t)}$.

Dessa forma, a resistência poderia ser caracterizada como sendo de natureza qualitativa, onde o aumento de dose do fungicida não implicaria em aumento na longevidade do produto, para um cenário em que não houvesse custo adaptativo envolvido.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 3. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de Naplic: (a) Naplic=1, (b) Naplic=2, (c) Naplic=3, (d) Naplic=6
AR = Resistentes; MR = Resistencia Parcial; S= Resistência Total

Figura 4. Relação entre Naplic e Tempo para Resistência

4.1.1 CII: Cálculo de T_{aRP} para diferentes valores de $Freq_{IMR}$

Os resultados apresentados na tabela 8 refere-se as estimativas de T_{aRP} e T_{aAR} considerando a alterações da variável $Freq_{IMR}$ sendo o número médio de duas aplicações de fungicidas durante a safra ($Naplic = 2$)

Tabela 8. Influência de $Freq_{IMR}$ no tempo de resistência (T_{aRP} e T_{aAR})

$Freq_{IMR}$	$Freq_{IR}$	T_{aRP}	T_{aAR}
10^{-5}	10^{-7}	6,6	5,6
10^{-4}	10^{-7}	6,6	5,6
10^{-3}	10^{-7}	4,6	5,6
10^{-2}	10^{-7}	3,6	5,6
10^{-1}	10^{-7}	1,6	5,6

(a)

(b)

Figura 5. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de $Freq_{iMR}$: (a) $Freq_{iMR} = 10^{-5}$, (b) $Freq_{iMR} = 10^{-1}$
 AR = Resistentes; MR = Resistencia Parcial; S= Resistência Total

Figura 6. Relação entre FreqiMR e TaRP

A simulação de FreqiMR pode contribuir para previsão de cenários em que haja uma possível perda parcial de sensibilidade do fungicida, nesse caso, a molécula envolvida teria sua eficiência reduzida, contudo, não haveria perda total de controle sobre o patógeno. Diante da Tabela 8, verifica-se que com o aumento dos valores de FreqiMR a partir de 10^{-4} haveria um aumento no período entre T_{aRP} e T_{aAR} , o que caracteriza uma observação de perda de eficiência parcial do fungicida. Porém, valores abaixo de 10^{-4} são pouco prováveis, segundo informações disponibilizadas pelo FRAC (FRAC, 2007), nesse caso, observa-se o mesmo comportamento apresentado no cenário CI, em que $T_{aRP} < T_{aAR}$ para valores de FreqiMR $\leq 10^{-4}$ caracterizando uma resistência de natureza qualitativa.

4.1.1 CIII: Cálculo de T_{aAR} para diferentes valores de FreqiR

Os resultados apresentados na Tabela 9 refere-se as estimativas de T_{aRP} e T_{aAR} considerando as alterações na variável FreqiMR e c o número médio de duas aplicações de fungicidas durante a safra ($N_{aplic} = 2$)

Tabela 9. Influência de FreqiMR no tempo de resistência (TaRP e TaAR)

FreqiR	FreqiMR	T_{aRP}	T_{aAR}
10^{-12}	10^{-5}	6,6	5,6
10^{-7}	10^{-5}	6,6	5,6
10^{-6}	10^{-5}	6,6	5,6
10^{-5}	10^{-5}	6,6	4,6
10^{-4}	10^{-5}	6,6	3,6

A partir dos dados da Tabela 9, observa-se que mesmo para um valor de FreqiR baixo ($\text{FreqiR} = 10^{-12}$), o tempo para a resistência (T_{aAR}) permaneceu praticamente constante para FreqiR variando entre 10^{-12} e 10^{-6} .

Contudo a partir de 10^{-5} houve redução de 1 ano para os biótipos resistentes, sugerindo que a influência de FreqiR é significativa, para os valores da variável considerados, a partir de $\text{FreqiR} \geq 10^{-5}$.

Ao trabalhar com *Mycosphaerella graminicola*, Scalliet et al. (2012) observaram uma alta variabilidade para diversas moléculas SDHI em relação à estimativa de FreqiR , estando seus valores entre 10^{-6} e 10^{-8} .

Dessa forma, valores maiores que 10^{-5} teriam baixa probabilidade de ocorrência caso o mesmo raciocínio fosse aplicado a *Phakopsora pachyrhizi*.

(a)

(b)

Figura 7. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de $Freq_{iR}$: (a) $Freq_{iR} = 10^{-12}$, (b) $Freq_{iMR} = 10^{-4}$
 AR = Resistentes; MR = Resistencia Parcial; S= Resistência Total

Figura 8. Relação entre FreqMR e TaAR

4.1.1 CIV: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes valores de $\gamma_{S,R}$ e $\gamma_{MR,R}$

As taxas de mutação, representadas por $\gamma_{S,R}$ e $\gamma_{MR,R}$ são variáveis de grande importância - e de difícil estimativa - que afetam significativamente T_{aAR} . Dessa forma, a combinação de valores de $\gamma_{S,R}$ e $\gamma_{MR,R}$ e suas influências no cálculo de T_{aAR} são apresentadas na Tabela 10 a seguir, considerando o número médio de duas aplicações de fungicidas durante a safra ($N_{aplic}=2$).

Tabela 10. Valores de TaAR para diferentes combinações de $\gamma_{S,R}$ e $\gamma_{MR,R}$

Valores de $\gamma_{S,R}$	Valores de $\gamma_{MR,R}$				
	10^{-12}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
10^{-12}	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
10^{-8}	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
10^{-6}	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
10^{-5}	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6
10^{-4}	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6

As estimativas da Tabela 10 revelam que: (i) a contribuição de $\gamma_{S,R}$ tem maior influência quando comparada a $\gamma_{MR,R}$. Tal fato é devido a FreqS ser muito maior que FreqMR no início da simulação.

Nesse contexto, a contribuição de $\gamma_{S,R}$ torna-se mais importante que $\gamma_{MR,R}$, para o desenvolvimento de resistência. Além disso, o modelo considera que indivíduos MR podem dar origem a indivíduos S, incluindo outro argumento que explicaria a menor contribuição de $\gamma_{MR,R}$ em relação a $\gamma_{S,R}$; (ii) Os valores de T_{aAR} diminuem consideravelmente a partir de $\gamma_{S,R} \geq 10^{-6}$, diminuindo em um ano o tempo para a resistência a cada aumento de 10 vezes na $\gamma_{S,R}$.

4.1.1 CV: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes α_S e α_{MR}

Os resultados apresentados na Tabela 11 refere-se as implicações da eficácia dos fungicidas para estimativas de T_{aRP} e T_{aAR} considerando o número médio de duas aplicações de fungicidas durante a safra ($N_{aplic}=2$).

Tabela 11. Influência de α_S no tempo de resistência (T_{aRP} e T_{aAR}) para $\alpha_{MR} = 0,6$

α_S	T_{aRP}	T_{aAR}
0,6	>50	13,7
0,7	28,6	10,6
0,8	13,7	7,6
0,9	6,6	5,6
1	0,6	0,6

Os resultados obtidos na Tabela 11 revelam a elevada contribuição da eficácia do fungicida para o tempo de resistência. Observa-se que, se por um lado a frequência de mutação é uma variável que apresenta impacto pouco significativo na ausência de um fator que promova seleção, no extremo oposto a eficácia da molécula sobre os indivíduos R, representada por α_S , exerce forte influência na diminuição de T_{aRP} e T_{aAR} , sendo o impacto maior para T_{aRP} em virtude da frequência de mutação de S para R ser menor que de S para MR ($\gamma_{S,MR} = 10^{-5}$ e $\gamma_{S,R} = 10^{-6}$) para o cenário proposto.

Dessa forma, é possível deduzir que, para moléculas com alta eficiência biológica o tempo para a resistência torna-se cada vez menor e que tal eficiência poderia ser interpretada como a magnitude da pressão de seleção exercida sobre a população.

estimado para a resistência total de 7,6 anos ($T_{aAR}=7,6$) e parcial de 13,7 ($T_{aRP}=13,6$), sugerindo, novamente, um tipo de resistência qualitativa.

A influência de α_{MR} na dinâmica populacional do patógeno pode ser observada na Tabela 12.

Tabela 12. Influência de α_{MR} no tempo de resistência (T_{aRP} e T_{aAR}) para $\alpha_S = 0,9$

α_{MR}	T_{aRP}	T_{aAR}
0,6	6,6	5,6
0,7	8,6	5,6
0,8	12,6	5,6
0,9	25,8	5,6

A Tabela 12 evidência um comportamento muito interessante com relação a $\text{Freq}_{MR(t)}$. Verifica-se que, o aumento nos valores de α_{MR} implicam maior tempo para a resistência de indivíduos MR (aumento de T_{aRP}), tal fato é devido à baixa Freq_{MR} e as taxas de mutações serem as mesmas para S e R ($\gamma_{MR,S} = \gamma_{MR,R} = 10^{-6}$). Dessa forma, um aumento de α_{MR} implicaria em redução significativa da população MR, que inicialmente apresenta-se baixa, culminando com as mesmas taxas de mutação para a geração de indivíduos S e R o que causaria maior contribuição para a população de S do que para R – que praticamente não se altera, devido $\text{Freq}_S > \text{Freq}_R$, explicando o aumento do tempo de resistência.

Em seu modelo estocástico, Milgroom (1989) explica que, a pressão de seleção exercida por um fungicida apresenta comportamentos distintos em relação ao tamanho da população afetada.

Nesse contexto, o autor conclui que, para baixas frequências de um determinado biótipo, um aumento da eficiência de um fungicida implicaria em menor probabilidade de atingir um limiar para resistência. Enquanto que para biótipos mais frequentes, o aumento da eficiência da molécula promoveria uma maior probabilidade para atingir o limiar de resistência, o que corrobora com o raciocínio apresentado no presente trabalho.

4.1.1 CVI: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes mr e mmr

Os resultados apresentados nas Tabelas 13 e 14 referem-se as estimativas de T_{aRP} e T_{aAR} considerando o conceito de custo adaptativo aplicado a taxa de reprodução do patógeno (mr e mmr).

Tabela 13. Influência do custo adaptativo na reprodução de indivíduos R (*mr*) sobre o tempo de resistência (T_{aAR} e T_{aRP}) para $mmr=ms=0$

<i>mr</i>	T_{aRP}	T_{aAR}
0	6,6	5,6
0,1	6,6	6,6
0,2	6,6	9,6
0,3	6,6	15,6
0,4	6,6	16,6

Tabela 14. Influência do custo adaptativo na reprodução de indivíduos MR (*mmr*) sobre o tempo de resistência (T_{aAR}) para $mr=ms=0$

<i>mmr</i>	T_{aRP}	T_{aAR}
0	6,6	5,6
0,1	10,6	5,6
0,2	25,8	5,6
0,3	25,8	5,6
0,4	25,8	5,6

Os resultados apresentados nas Tabelas 13 e 14 expõem a forte influência do custo adaptativo na taxa de reprodução dos organismos R e MT, respectivamente. Diante dos dados, verifica-se que para os indivíduos R, uma alteração de *mr* de 0 para 0,3 triplica o tempo necessário para resistência, podendo essa diferença ser maior caso haja uma maior produção de esporos.

Para os indivíduos MR, a influência em *mmr* mostram-se ainda mais significativas, sendo que a alteração de *mmr* de 0 para 0,3 praticamente quadruplicou T_{aRP} , ficando estável a partir de 0,3 (25,8 anos). A maior influência sobre MR pode ser explicada em virtude da limitação ocasionada pela taxa de reprodução dos indivíduos MR e dos baixos valores de $FreqiM_R$ sendo assim, maiores valores de *mmr* não ocasionariam grandes nas estimativas de T_{aRP} .

Outra observação que merece destaque, relaciona-se ao impacto de *mr* na dinâmica da população do patógeno. Assim, caso haja um pequeno custo adaptativo ($mr \geq 0,1$) que afete a taxa de reprodução de indivíduos R e não afete indivíduos MR, poderia ser observado em condições práticas de campo, uma queda de performance do fungicida – devido a prevalência de indivíduos MR – para, em um segundo momento, ocorrer a perda significativa de eficiência da molécula mesmo para valores reduzidos de $FreqiM_R$.

Informações relacionadas ao conceito de custo adaptativo são de difícil acesso e podem apresentar grandes variações dependendo do patógeno estudado.

Para *Phakopsora pachyrhizi*, Klosowski et al. (2016) demonstraram que há custo adaptativo envolvido para fungicidas DMIs, porém não aos QoI. Contudo, este custo estaria relacionado a menor adaptabilidade dos isolados mutantes, o que pode ser modelado com alterações dos parâmetros λ_r e λ_{mr} (cenário CVII). Os autores não abordaram a influência do custo adaptativo para SDHI em virtude dessas moléculas não estarem registradas para a cultura da soja.

Figura 11. Representação gráfica da evolução de biótipos do patógeno para diferentes valores de mmr : (a) $mmr=mr=0$, (b) $mr=0,4$, (c) $mmr=0,4$
AR = Resistentes; MR = Resistencia Parcial; S= Resistência Total

Figura 12. Relação entre taxa de mortalidade (mr e mmr) e Tempo para a Resistência

4.1.1 CVII: Cálculo de T_{aRP} e T_{aAR} para diferentes valores de λ_r e λ_{mr}

Os resultados apresentados nas tabelas 15 e 16 referem-se as estimativas de T_{aRP} e T_{aAR} considerando o custo adaptativo relacionado a taxa de sobrevivência (λ_r e λ_{mr}) dos indivíduos R e MT, respectivamente.

Tabela 15. Influência de λ_r no tempo de resistência (T_{aRP} e T_{aAR}) para $\lambda_{mr} = 1$

λ_r	T_{aRP}	T_{aAR}
1	6,6	5,6
0,9	6,6	5,6
0,8	6,6	5,6
0,7	6,6	6,6
0,6	6,6	6,6
0,5	6,6	7,6

Tabela 16. Influência de λ_{mr} no tempo de resistência (T_{aRP} e T_{aAR}) para $\lambda_r = 1$

λ_{mr}	T_{aRP}	T_{aAR}
1	6,6	5,6
0,9	7,6	5,6
0,8	7,6	5,6
0,7	8,6	5,6
0,6	9,6	5,6
0,5	12,6	5,6

Os resultados das Tabelas 15 e 16 revelam que, para indivíduos R, havendo custo adaptativo que afete o período de sobrevivência do patógeno após a safra, representado por λ_r , poderá haver redução de até 2 anos, considerando as variáveis do cenário VII. Contudo, a taxa de sobrevivência mostra-se menos relevante quando comparada ao custo envolvendo a taxa de reprodução, ou seja, sua variação é menor para valores decrescentes de λ_r . Tal resultado poderia ser um argumento plausível para justificar a não retomada de eficiência de certos fungicidas DMI, mesmo após seu uso reduzido devido à perda de eficiência, como mostram os resultados do Consórcio Antiferrugem para alguns produtos isolados a base de triazóis, como por exemplo o tebuconazol e ciproconazol.

Para os indivíduos MR, o impacto da taxa de sobrevivência após safra (λ_{mr}) é mais relevante, podendo variar em até 6 anos entre condições de ausência de custo adaptativo ($\lambda_{mr}=1$) e redução de 50% ($\lambda_{mr}=0,5$). Nesse caso, a redução crescente da população de MR após a safra aliado a uma taxa de mutação igual para R e S ($\gamma_{MR,S} = \gamma_{MR,R} = 10^{-6}$) resulta em uma taxa de crescimento mais reduzida quando comparada a taxa de crescimento de indivíduos R, o que pode ser confirmado quando compara-se T_{aRP} e T_{aAR} , sendo $T_{aAR} > T_{aRP}$ para todas as variações de λ_{mr} e para $\lambda_r = 1$.

Figura 13. Relação entre Taxa de Sobrevivência e Tempo para a Resistência

4.2 Análise de cenários considerando incertezas

A partir dos valores atribuídos para as variáveis determinísticas e estocásticas e empregando a simulação de Monte Carlo, foi possível estimar $E(T_{aRP})$ e $E(T_{aAR})$, bem como $Var(T_{aRP})$ e $Var(T_{aAR})$, conforme a Tabela 17.

Tabela 17. Estimativas de $E(T_{aAR})$, $Var(T_{aAR})$, $E(T_{aRP})$, $Var(T_{aAR})$ para os cenários estocásticos

Cenário Estocástico	Variável	Distribuição	Intervalo	$E(T_{aAR})$	$Var(T_{aAR})$	$E(T_{aRP})$	$Var(T_{aAR})$
C1	Freq _{iR}	Uniforme ($a=10^{-12}, b=10^{-3}$)	$[10^{-12}, 10^{-3}]$	3,14	0,23	5,34	0,22
	Freq _{iMR}	Uniforme ($a=10^{-12}, b=10^{-3}$)	$[10^{-8}, 10^{-3}]$				
	$\gamma_{S,R}$	Uniforme ($a=10^{-12}, b=10^{-3}$)	$[10^{-8}, 10^{-4}]$				
	$\gamma_{S,MR}$	Uniforme ($a=10^{-12}, b=10^{-3}$)	$[10^{-7}, 10^{-4}]$				
	$\gamma_{MR,S}$	Uniforme ($a=10^{-12}, b=10^{-3}$)	$[10^{-12}, 10^{-6}]$				
	$\gamma_{MR,R}$	Uniforme ($a=10^{-12}, b=10^{-3}$)	$[10^{-7}, 10^{-4}]$				
C2	Freq _{iR}	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-12}, 10^{-3}]$	3,29	0,26	5,58	0,24
	Freq _{iMR}	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-8}, 10^{-3}]$				
	$\gamma_{S,R}$	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-8}, 10^{-4}]$				
	$\gamma_{S,MR}$	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-7}, 10^{-4}]$				
	$\gamma_{MR,S}$	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-12}, 10^{-6}]$				
	$\gamma_{MR,R}$	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-7}, 10^{-4}]$				
C3	Freq _{iR}	Beta truncada ($\alpha=0,6$ e $\beta=0,4$)	$[10^{-12}, 10^{-3}]$	2,71	0,37	4,78	0,35
	Freq _{iMR}	Beta truncada ($\alpha=0,6$ e $\beta=0,4$)	$[10^{-8}, 10^{-3}]$				
	$\gamma_{S,R}$	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-8}, 10^{-4}]$				
	$\gamma_{S,MR}$	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-7}, 10^{-4}]$				
	$\gamma_{MR,S}$	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-12}, 10^{-6}]$				
	$\gamma_{MR,R}$	Beta truncada ($\alpha=0,4$ e $\beta=0,6$)	$[10^{-7}, 10^{-4}]$				

Os resultados apresentados para os cenários estocásticos demonstram que não houve diferenças significativas entre o número médio de anos para que ocorresse o processo de resistência total, representado por $E(T_{aAR})$, e parcial, representado por $E(T_{aRP})$, ou seja, estes valores variaram entre 2,71 a 3,14 para $E(T_{aAR})$ e de 4,78 a 5,34 para $E(T_{aRP})$.

Dessa forma, independente da distribuição considerada no trabalho em questão, e mesmo em cenários extremos para valores de frequências iniciais e taxa de mutação (C2 e C3), tais variáveis apresentam baixa relevância para alterar significativamente o tempo de resistência de um determinado produto, verificando-se ainda um tempo muito reduzido para que fosse constatado o processo de resistência total e parcial, o que torna imprescindível a associação de fungicidas SDHI com outros fungicidas de diferentes mecanismos de ação, ou mesmo, sua rotação com outras moléculas.

Outra questão importante está relacionada ao tempo de resistência total e parcial. Para todos os cenários envolvidos, o processo de resistência total, representado por T_{aAR} , é sempre menor que o tempo de resistência parcial (T_{aRP}), ou seja, há fortes indícios de que a resistência poderia ser de natureza qualitativa. Dessa forma, haveria e perda significativa de eficiência em um curto intervalo de tempo, conforme demonstrado pelos resultados.

(a)

(b)

Figura 14. Histograma representando TaAR (a) e TaRP (b) para o cenário C1

(c)

(d)

Figura 15. Histograma representando TaAR (c) e TaRP (d) para o cenário C2

(e)

(f)

Figura 16. Histograma representando TaAR (e) e TaRP (f) para o cenário C3

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados é possível concluir que:

- (i) As variáveis que apresentam maior contribuição para a aceleração do processo de resistência, correspondem ao número de aplicação de fungicidas seguidas pela eficiência do mesmo. Tais variáveis contribuem para redução de forma exponencial quando comparadas a outras variáveis como a frequência de mutação e frequência inicial do genótipo resistente;
- (ii) Embora tenha contribuição para o processo de resistência, as frequências de mutação bem como a frequência inicial dos genótipos resistentes não contribuem significativamente quando analisados de forma isolada e em cenários combinados envolvendo incertezas. Esse fato deve-se aos baixos valores atribuídos segundo informações do FRAC e de trabalhos publicados, e que, quando simulados pelo modelo não causaram variações significativas no tempo de resistência em cenários em que o número de aplicações fosse mantido constante e na ausência de custo adaptativo;
- (iii) O conceito de custo adaptativo (*fitness penalty*) causa grande impacto para o processo de resistência, aumentando exponencialmente a vida útil de fungicidas quando o patógeno apresenta alterações que culminam em uma redução na sua taxa de reprodução (maior contribuição) ou taxa de sobrevivência (menor contribuição). Nesse contexto, torna-se imprescindível a realização de trabalhos que visem elucidar e quantificar tal variável para os fungicidas SDHI em relação ao fungo *Phakopsora pachyrhizi*; e
- (iv) Considerando o número de aplicações limitado a 2, conforme recomendação do FRAC, e caso tal feito ocorresse de forma generalizada em território nacional, haveria grande possibilidade de perda de eficácia de fungicidas SDHI para o controle de *Phakopsora pachyrhizi* em aproximadamente 3,3 anos safra, sendo que tal resistência seria de natureza qualitativa.

REFERÊNCIAS

- AVENOT, H.F.; THOMAS, A.; GITAITIS, R.D.; LANGSTON JUNIOR, D.B.; Stevenson, K.L. Molecular characterization of boscalid-and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. *Pest management science*, v.68, n.4, p.645-651. 2012.
- BENDER, E.A. An introduction to mathematical modelling. Wiley, New York.sity Press, Cambridge, UK. 1978.
- BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W. Fungicides Resistance in Plant Management: How can it be managed? 2007. Retrieved from www.frac.info.
- BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science*, v.20, p.254-255, 1980.
- BURGER, G.; LANG, B.F.; REITH, M.; GRAY, M.W. Genes encoding the same three subunits of respiratory complex II are present in the mitochondrial DNA of two phylogenetically distant eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.93, n.6, p.2328-2332, 1996. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2328>.
- DEISING, H.B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S.F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, n.2, p.286-295. 2008. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>.
- DEL PONTE, E.M.; GODOY, C.V.; CANTERI, M.G.; REIS, E.M.; YANG, X.B. Models and applications for risk assessment and prediction of Asian soybean rust epidemics. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, n.6, p.533-544, 2006. <http://doi.org/10.1590/S0100-41582006000600001>.
- EDWARDS, A.W.F. Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetics*, v.179, n.3, p.1143-1150, 2008. <http://doi.org/10.1534/genetics.104.92940>.
- 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*, v.13, n.3, p.263-275, 2012. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x>.
- FREIRE, M.C.M.; DE OLIVEIRA, L.O.; ALMEIDA, A.M.R.; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M.A.; LIEBENBERG, M.M.; MIENIE, C.M.S. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. *Genet. Mol. Biology*, v.31, p.920-931, 2008.
- FRAC. FRAC Code List 2016. FRAC Monography, p.1-10. 2016. Retrieved from <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4>.

FREIRE, M.; OLIVEIRA, L.; ALMEIDA, A.M.R.; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M.A.; LIEBENBERG, M.M.; MIENIE, C.M.S. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. *Genetic and Molecular Biology*, v.31, n.4, p.920-931, 2008. <http://doi.org/10.1590/s1415-47572008005000026>.

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. Pathogen risk list, (December), 1–5. 2013. Retrieved from <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf>.

GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; MCCAFFERY, A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*, v.58, n.9, p.859-867, 2002.

GODOY, C.V.; FLAUSINO, A.M.; SANTOS, L.C.M.; DEL PONTE, E.M. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. *Tropical Plant Pathology*, v.34, n.1, p.56-61, 2009. <http://doi.org/10.1590/S1982-56762009000100011>.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust: Pathogen profile. *Molecular Plant Pathology*, v.11, n.2, p.169-177, 2010. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00589.x>.

HARRISON, R.L. Introduction to Monte Carlo Simulation. *AIP Conf. Proc.*, v.1204, p.17-21, 2010. <http://doi.org/10.1063/1.3295638.Introduction>.

HUANG, S.; MILLAR, A.H. Succinate dehydrogenase: The complex roles of a simple enzyme. *Current Opinion in Plant Biology*, v.16, n.3, p.344-349, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.007>.

KAMEI, S.; TOKUNAGA, Y.; OKAMOTO, M. Uredinales found in the Daisetsuzan National Park Hokkaido, v.38, 1957.

KEON, J.P.R.; WHITE, G.A.; HARGREAVES, J.A. Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, v.19, n.6, p.475-481, 1991. <http://doi.org/10.1007/BF00312739>.

KOCH, E.; EBRAHIMNESBAT, F.; HOPPE, H.H. Light and electronmicroscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.106, p.302-320, 1983.

KOCH, E.; HOPPE, H.H. Effect of light on uredospore germination and germ tube growth of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd). *Phytopathologische Zeitschrift*, v.119, p.64-74, 1987.

KLOSOWSKI, A.C. Sensibilidade de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* aos Fungicidas tebuconazol (inibidor da desmetilação) e azoxistrobina (inibidor da quinona externa). Universidade Federal Do Paraná. Curitiba, 2015.

KNIGHT, F.; OF, R.; CLASSICS, E. Risk, Uncertainty and Profit. Climate Change 2013 - The Physical Science Basis, XXXI, p.1-30, 1921. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

DANELLI, A.L.D.; REIS, E.M. Quantification of incubation, latent and infection periods of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean, according to chronological time and degree-days. Summa phytopathologica, Botucatu, v.42, n.1, p.11-17, Mar. 2016. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052016000100011&lng=en&nrm=iso. Access on 28 May 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/1920MAIA>, A. (2003). Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas: quantificação de risco utilizando análise de incertezas. Dissertação.

MILGROOM, M. (1989). A stochastic model for the initial occurrence and development of fungicide resistance in plant pathogen populations. Phytopathology. Retrieved from http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1990Articles/Phyto80n04_410.PDF

MIYAMOTO, T.; ISHII, H.; STAMMLER, G.; KOCH, A.; OGAWARA, T.; TOMITA, Y.; KOBORI, S. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. Plant Pathology, v.59, n.5, p.873-881, 2010. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02321.x>.

MIYAMOTO, T.; ISHII, H.; TOMITA, Y. Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and molecular characterization of the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. Journal of General Plant Pathology, v.76, n.4, p.261-267. 2010. <http://doi.org/10.1007/s10327-010-0248-z>.

MURRAY, J.D. Mathematical Biology : I. An Introduction, Third Edition. Interdisciplinary Applied Mathematics, v.1. 2001. <http://doi.org/10.1086/421587>.

ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN, J.F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. Mycol. Res., v.96, p.825-850. 1992.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REIS, E.M.; BRESOLIN, A.C.R.; CARMONA, E.M. Doenças da soja I: Ferrugem asiática. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 2006.

RICHETTI, A.; ROESE, A.D. Custo do Controle Químico da Ferrugem-Asiática-da-Soja para a Safra 2010/11, p.1-6, 2011.

RODRIGUES, M.A.T. Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo Frac, 249. 2006.

RUSSELL, P.E. Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. FRAC Monograph, 3, 56. 2004. <http://doi.org/10.1564/17jun07>.

SCALLIET, G.; BOWLER, J.; LUKSCH, T.; KIRCHHOFFER-ALLAN, L.; STEINHAEUER, D.; WARD, K.; FONNÉ-PFISTER, R. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. PLoS ONE, v.7, n.4, 2012. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0035429>.

SCHMITZ, H.K.; MEDEIROS, C.A.; CRAIG, I.R.; STAMMLER, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-oxidase-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. Pest Management Science, v.70, n.3, p.378-388, 2014.

SIEROTZKI, H.; SCALLIET, G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. Phytopathology, v.103, n.9, p.880-887, 2013. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>.

SKYLAKAKIS, G. Effects of Alternating and Mixing Pesticides on the Buildup of Fungal Resistance. Phytopathology. 1981. <http://doi.org/10.1094/Phyto-71-1119>

VANDERPLANK, J.E. Plant Diseases: Epidemics and Control. Academic Press, New York. 1963.

VITTAL, R.; YANG, H.C.; HARTMAN, G.L. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. European Journal of Plant Pathology, v.132, n.2, p.163-167. 2012. <http://doi.org/10.1007/s10658-011-9872-5>.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.E.; NUNES, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. Plant Disease, v.89, p.675-677, 2005.

ZANATTA, T.; MELO, E.; ZANATTA, M. Adjuvant concentrations and uredospore densities on *Phakopsora pachyrhizi* infection efficiency in soybean, p.148-151. 2012.