

PODEM OS INIBIDORES DE BOMBA DE EFLUXO REVERTER O FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA MULTIDROGAS EM *Pyricularia oryzae*?

ASSIS JR, F. G.¹; CERESINI, P. C.¹; CARLA, T. C.¹, VICENTINI, S. N. C.¹

¹Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Os fungos do gênero *Pyricularia* (brusones) são responsáveis por perdas significativas em cultivos de arroz e trigo. A linhagem Triticum da espécie *P. oryzae* (*PoTl*) é uma ameaça à triticultura nacional e internacional, tendo emergido primeiro em áreas de cultivo brasileiras e depois introduzida na Ásia e África, por meio de importação de sementes de trigo infectadas. Esta linhagem em particular apresenta resistência aos principais fungicidas de sítio-alvo específicos, com os inibidores de quinona (QoIs), inibidores da succinato desidrogenase (SDHs) e inibidores da esterol 14-demetilase (DMIs). Enquanto se atribui a resistência única contra moléculas específicas às mutações nos sítios-alvo, a ausência de mutações e a resistência múltipla encontrada em populações de *PoTl* levantam a hipótese de que um outro mecanismo de resistência pode estar envolvido. Um destes, encontrado em outras espécies de fungos, é a sobre expressão de bombas de efluxo, que são transportadores membranares responsáveis pelo fluxo de moléculas do meio intracelular para o extracelular e vice-versa. Em fungos, há duas principais famílias de transportadores que podem assumir esse papel na resistência multidrogas: os transportares ABC (ATP-binding cassette) e os MFS (Major Facilitator Superfamily). Este trabalho teve como objetivo submeter isolados de *PoTl* ao inibidor de transportadores ABC, cloridrato de verapamil, na presença de fungicidas dos grupos SDHI e DMI. Os resultados indicam que a resistência multidrogas não deve ter origem na super expressão de transportadores ABC, permanecendo a hipótese de que as bombas de efluxo sejam transportadores do tipo MFS em populações sem mutações de resistência nos sítios-alvo.

Palavras-chave: ; Tebuconazole; ATP-binding cassette; cloridrato de verapamil.

INTRODUÇÃO

O complexo *Pyricularia* (Ascomycota) compreende as espécies de fungos causadores das doenças conhecidas como brusone, responsáveis por perdas significativas de produção em culturas importantes como arroz, trigo, cevada, aveia e milho (COUCH et al. 2005; MURAKAMI et al. 2003; TAKABAYASHI et al., 2002; URASHIMA et al., 2009). Em particular para o trigo, atribui-se à linhagem Triticum da espécie *Pyricularia oryzae* (*PoTl*) o papel de agente causal da brusone do trigo (GLADIEUX et al., 2018), com a ressalva de que não se trata de uma linhagem com hospedeiro específico, em contraste com outra linhagem conhecida, a saber *P. oryzae* linhagem Oryzae (*PoOl*), associada apenas à brusone do arroz (CASTROAGUDÍN et al., 2016). *PoTl* é capaz de colonizar espécies cultivadas incluindo cevada, aveia, azevém e braquiária, bem como gramíneas nativas e exóticas de ocorrência comum e plantas espontâneas em áreas de trigo, dentre elas *Chloris distichophylla*, *Cynodon* spp., *Digitaria insularis*, *Equinochloa crusgalli*, *Panicum maximum*, *Rhynchelytrum repens* e *Sorghum sudanense* (CASTROAGUDÍN et al. 2017). Trata-se de uma doença de difícil controle, cujas perdas causadas em áreas de cultivo de trigo podem chegar, em peso por espiga,

nas ordens de 46 a até 72,5%, com menores perdas observadas na infecção tardia e maiores quando a infecção foi precoce (GOULART et al., 2007; GOULART e PAIVA, 2000).

Há grande preocupação em se tratando do manejo da doença em virtude do uso generalizado de fungicidas com sítios-alvo específicos sem a adoção de estratégias a fim de evitar a seleção de genótipos resistentes, levando à queda da eficiência destas moléculas (CERESINI et al., 2018, PAGANI et al., 2014), já havendo sido encontrados isolados de *PoTl* resistentes a fungicidas QoI - inibidores de quinona - e DMIs - inibidores da esterol 14-demetilase (Castroagudín et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Poloni et al., 2020). A resistência aos fungicidas QoI está diretamente relacionada à mutação no citocromo B, com a alteração do aminoácido glicina (G) por alanina (A) na posição 143 da proteína (G143A), encontrada em outras espécies e gêneros além da *Pyricularia oryzae* (CASTROAGUDÍN et al., 2015). A resistência contra os fungicidas DMIs, ou azóis, são explicadas por uma mutação não sinônima no sítio-alvo esterol 14-demetilase, entretanto, também foram encontrados isolados resistentes sem esta mutação (POLONI et al., 2020). Levantou-se a hipótese de que esta resistência seja oriunda da superexpressão do gene *CYP51*, causada por inserções em sua região promotora, porém tais inserções não foram encontradas nos genes *CYP51A* e *CYP51B* dos isolados brasileiros de *PoTl*, tornando o mecanismo de resistência a azóis ainda passível de elucidação (POLONI et al., 2020).

A ausência de sensibilidade em *PoTl* se estende a moléculas às quais as populações do patógeno ainda não haviam sido expostas em campo. Este é o caso da resistência a fluxapiroxade, molécula da classe das carboxamidas, inibidoras da succinato desidrogenase (VICENTINI et al., 2021). Uma vez que o patógeno apresenta este comportamento com uma molécula à qual ainda não havia sido exposto, somado aos relatos de ausência de mutação nos genes alvo *sdhB*, *sdhC* e *sdhD*, levante-se a hipótese de que a origem para essa resistência seja algum mecanismo pré-existente e inespecífico. Este mecanismo, caracterizado pela resistência multidrogas, poderia ser a superexpressão de bombas de efluxo, observado em outros patógenos (KRETSCHMER et al., 2009, OMNRANE et al., 2015, FISCHER et al., 2018, WANG et al., 2018).

Há duas principais classes de transportadores capazes de agir como bombas de efluxo para moléculas fungicidas: os transportadores ABC (ATP-binding cassette), utilizadores de ATP no transporte de moléculas na membrana, e os MFS (major facilitator superfamily), os quais utilizam fluxo de prótons na transferência de moléculas (PERLIN et al., 2014). Estas duas superfamílias correspondem a aproximadamente metade de todos os genes codificadores de transportadores membranares dos fungos (PAULSEN et al., 1998). As duas categorias de transportadores ocorrem em diferentes tipos de membranas, como vacuolares, do retículo endoplasmático, peroxissomas e das mitocôndrias (ESQUIVEL e WHITE, 2017; PERLIN et al., 2014; SUN et al., 2006; THOMAS e TAMPÉ, 2020).

O cloridrato de verapamil (VER) se mostrou um potencial candidato a inibidor dos transportadores do tipo ABC. Gupta e colaboradores, expondo *Mycobacterium tuberculosis* ao antibiótico rifampicina in vitro, encontraram quantidade duas vezes maior da molécula dentro das células bacterianas tratadas com VER em contraste com as testemunhas (GUPTA et al., 2013). Para o fungo *Candida albicans*, doses de VER inibiram o transporte da adesina Hwp1, associada ao desenvolvimento de hifa e sua adesão (YU et al., 2014). Uma vez observada a

resistência multidrogas em *P. oryzae* linhagem Triticum, assim como a ausência de algumas das principais mutações para resistência às principais classes fungicidas, o objetivo deste trabalho foi testar a hipótese das bombas de efluxo como mecanismo de resistência multidrogas utilizando cloridrato de verapamil como inibidor de transportadores da família ABC.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de detecção da inibição de bombas de efluxo foram conduzidos em microplacas plásticas de fundo plano contendo 96 poços individuais (Kasvi, Itália), utilizando-se fragmento micelial, em protocolo adaptado de Brito et al. (2020) e Peláez Montoya et al. (2006) no laboratório de fitopatologia e genética molecular da FEIS/UNESP, campus de Ilha Solteira. Os isolados de *PoTl* utilizados são oriundos de populações amostradas nos anos 2012 e 2018, nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e no Distrito Federal. A Tabela 1 contém a relação dos isolados utilizados.

Tabela 1 - Nomenclatura dos isolados, espécies, local e ano de amostragem populacional.

Isolado	Espécie	Local	Ano
12.1.045i	<i>PoTl</i>	SP	2012
12.1.130	<i>PoTl</i>	MS	2012
12.1.037	<i>PoTl</i>	DF e GO	2012
12.1.299	<i>PoTl</i>	PR	2012
12.1.015	<i>PoTl</i>	MG	2012
12.1.183	<i>PoTl</i>	MS	2012
12.1.165	<i>PoTl</i>	DF e GO	2012
12.1.312	<i>PoTl</i>	PR	2012
12.1.005	<i>PoTl</i>	MG	2012
18SPK6	<i>PoTl</i>	SP	2018
18SPC10	<i>PoTl</i>	SP	2018
18MGH19	<i>PoTl</i>	MG	2018
18MGH25	<i>PoTl</i>	MG	2018
18MGF3	<i>PoTl</i>	MG	2018

O micélio foi obtido a partir de colônias dos isolados com 10 dias de incubação em meio ágar aveia (30 g.L⁻¹ de aveia integral em flocos finos, 25 g.L⁻¹ de ágar e 0,5 g.L⁻¹ do antibiótico cloranfenicol), submetidas à temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas dentro de incubadora tipo BOD. Das colônias, extraiu-se o micélio, transferindo-o para microtubos contendo 0,5 mL em volume de esferas de vidro estéreis com 2 mm de diâmetro e 1 mL de água destilada. A matéria fúngica foi fragmentada utilizando *fast-prep* ajustado para a velocidade 4.0 (4 m.s⁻¹) durante 20 segundos.

As suspensões foram diluídas para o volume final de 15 mL, sendo ajustadas para 10⁴ fragmentos por mL em câmara de Neubauer. Cada microplaca recebeu 50 µL da suspensão

biológica e 100 μL de meio de cultura líquido PD (dextrose de batata), com concentrações variáveis dos inibidores a serem testados. O meio líquido continha 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de cloranfenicol e estreptomicina

Inicialmente, determinou-se a dose máxima tolerada (DMT) de VER medindo o crescimento relativo de quatro isolados de *Pyricularia oryzae*, dois da linhagem Triticum (18MGH11 e 19MGF3) e dois da linhagem Oryzae (421 e 656). Foram testadas as doses 0,0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg.mL^{-1} (VEGA-CHACÓN et. al 2020). Determinada a DMT em 1,0 mg.mL^{-1} , foram conduzidos quatro experimentos em delineamento fatorial com dois fatores: isolados (N=14) e combinações de VER e fungicidas conforme a seguir:

- a) testemunha; VER a 1,0 mg.mL^{-1} ; fluxapiroxade a 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; VER com SDHI;
- b) testemunha; VER a 1,0 mg.mL^{-1} ; tebuconazol a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; VER com DMI;

Os experimentos tiveram quatro repetições para cada unidade experimental e o total foi repetido uma vez. As microplacas foram incubadas para crescimento em incubadora BOD sob temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas durante 120 horas. O crescimento dos isolados foi medido indiretamente pelos valores de absorvância no comprimento de onda de 620 nm usando leitora de microplacas (MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo ScientificTM, EUA).

Após as leituras no tempo zero (C_{t_0}) – imediatamente após a incrementação da solução micelial à microplaca – e no tempo um (C_{t_1}) – após 120h – calculou-se a variação do crescimento ΔC (1) e o crescimento relativo individual CR (2) para cada isolado conforme as fórmulas:

$$\Delta C = C_{t_1} - C_{t_0} \quad (1)$$

$$CR = \frac{\Delta C_{\text{tratamento}}}{\Delta C_{\text{testemunha}}} \quad (2)$$

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5% de probabilidade utilizando ambiente R (R Core Team, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados 12.1.005, 18MGH25, 18SPC10 e 18MGH19 apresentaram fenótipo de resistência ao fungicida DMI tebuconazol (Figura 1), enquanto 12.1.037 e 12.1.130 apresentam fenótipo de resistência a ambos, tebuconazol e o SDHI fluxapiroxade (Figura 1 e Figura 2). Estes dois últimos, apesar do fenótipo indicativo de resistência multidrogas, mantiveram o crescimento mesmo na presença do inibidor dos transportadores ABC cloridrato de verapamil.

Os demais isolados apresentaram fenótipo de sensibilidade com $CR \leq 50\%$ ou sensibilidade reduzida com crescimento relativo superior a 50% a um ou mais fungicidas. Dorigan e colaboradores, estudando a resistência a tebuconazol em espécies de *Pyricularia*, observaram resistência em todas as quatro (DORIGAN et al., 2019). Este mesmo comportamento pode ser observado nos isolados do presente trabalho, com um padrão de sensibilidade reduzida a DMI em populações com seis anos de diferença de amostragem.

Isolados cujos crescimentos não diferiram estatisticamente em todos os tratamentos podem possuir algum mecanismo de resistência multidrogas, porém a não observação de reversão de fenótipo quando tratados com VER indica que, caso esse mecanismo seja realmente por bombas de efluxo, de fato encontrado em outras espécies de fungos como *Candida albicans* (CANNON et al., 2009) este não seria pela super expressão dos transportadores do tipo ABC.

Ainda assim, permanece a hipótese de que a super expressão dos transportadores MFS possam ser a causa para o fenótipo de resistência múltipla observado na linhagem Triticum de *P. oryzae*.

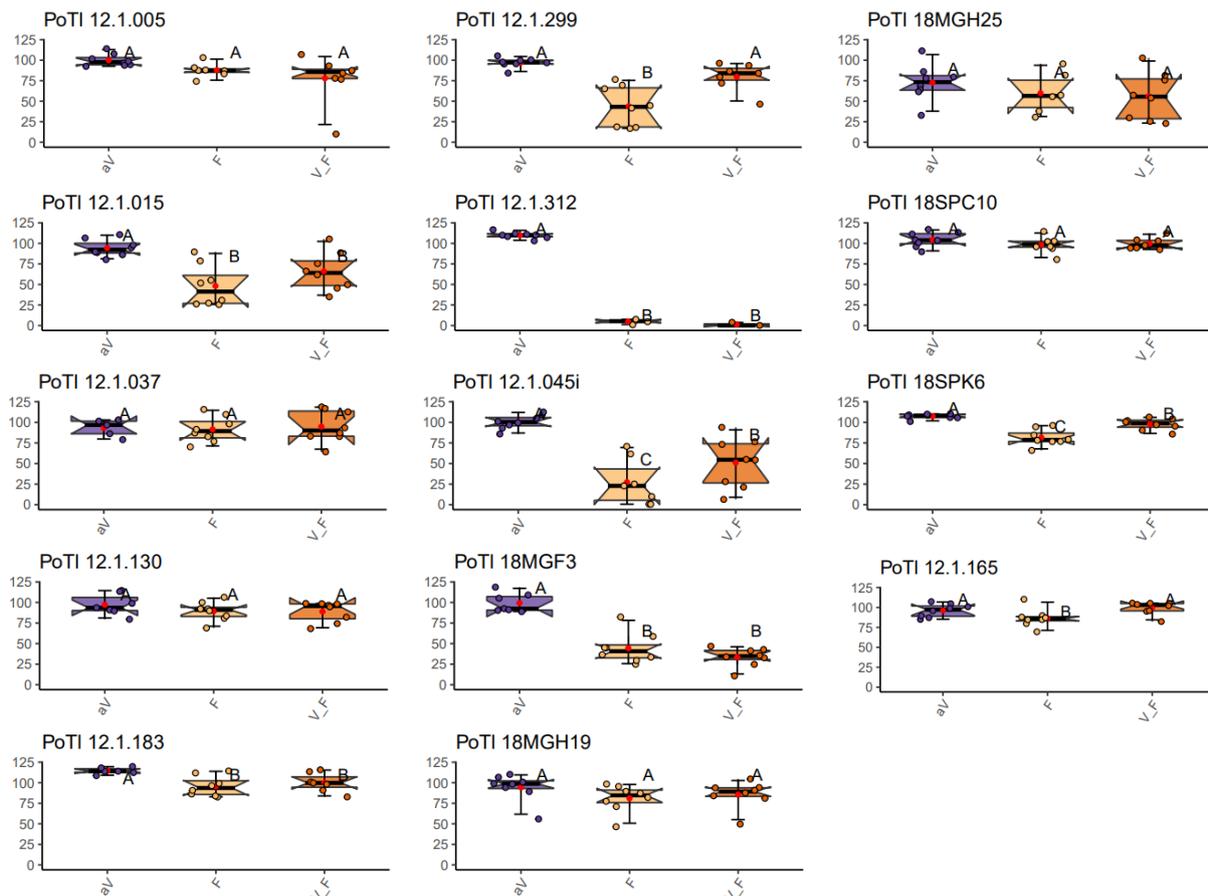


Figura 1. Boxplots representando o crescimento relativo de cada isolado no eixo vertical e os tratamentos com inibidor, tebuconazol e VER combinado com tebuconazol no eixo horizontal, respectivamente. Boxplots com letras maiúsculas iguais não diferem significativamente com o teste de comparação Skott-Knott a 5% de probabilidade.

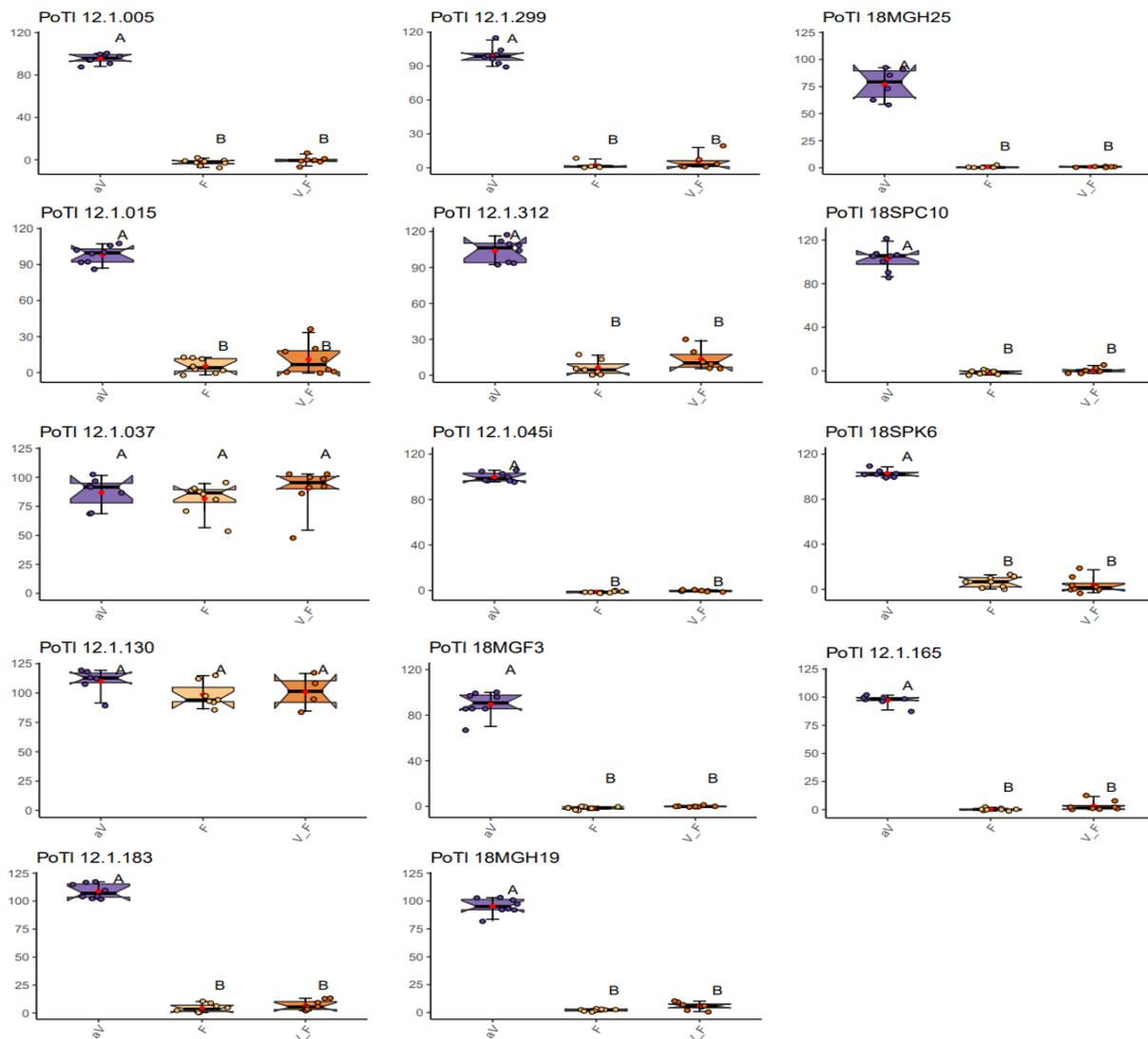


Figura 2. Boxplots representando o crescimento relativo de cada isolado no eixo vertical e os tratamentos com inibidor, fluxapiroxade e VER combinado com fluxapiroxade no eixo horizontal, respectivamente. Boxplots com letras maiúsculas iguais não diferem significativamente com o teste de comparação Skott-Knott a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Os isolados estudados da linhagem Triticum de *Pyricularia oryzae* apresentaram padrão majoritário de sensibilidade ao fungicida SDHI fluxapiroxade, em contraste com o fungicida DMI tebuconazol, ao qual demonstraram sensibilidade reduzida ou resistência.

Os isolados 12.1.037 e 12.1.130, com fenótipo de resistência a ambos, não tiveram crescimento inibido na presença de verapamil, evidenciando que o mecanismo de resistência para estas populações não é a super expressão das bombas de efluxo do tipo ABC.

REFERÊNCIAS

COUCH, B.C.; FUDAL, I.; LEBRUN, M.H.; THARREAU, D.; VALENT, B. et al. Origins of Host-Specific Populations of the Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in Crop Domestication With Subsequent Expansion of Pandemic Clones on Rice and Weeds of Rice. **Genetics**, v. 170, n. 2, p. 613–630, 1 jun. 2005.

MURAKAMI, J.; TOMITA, R.; KATAOKA, T.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Analysis of Host Species Specificity of *Magnaporthe grisea* Toward Wheat Using a Genetic Cross Between Isolates from Wheat and Foxtail Millet. **Phytopathology**®, v. 90, n. 10, p. 1060–1067, out. 2000.

TAKABAYASHI, N. et al. A Gene-for-Gene Relationship Underlying the Species-Specific Parasitism of Avena/Triticum Isolates of *Magnaporthe grisea* on Wheat Cultivars. **Phytopathology**®, v. 92, n. 11, p. 1182–1188, nov. 2002.

URASHIMA, A.S.; GROSSO, C.R.F.; STABILI, A.; FREITAS, E.G.; SILVA, C.P. et al. Effect of *Magnaporthe grisea* on Seed Germination, Yield and Quality of Wheat. In: WANG, G.-L.; VALENT, B. (Eds.). **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p. 267–277.

GLADIEUX, P.; CONDON, B.; RAVEL, S.; SOANES, D.; MACIEL, J.L.N. et al. Gene Flow between Divergent Cereal- and Grass-Specific Lineages of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **mBio**, v. 9, n. 1, p. e01219-17, 7 mar. 2018.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A.R.; NIIMI, K.; BARET, P.V.; KENIYA, M.V.; TANABE, K. et al. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, abr. 2009.

CASTROAGUDÍN, V.L.; MOREIRA, S.I.; PEREIRA, D.A.S.; MOREIRA, S.S.; BRUNNER, P.C. et al. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 37, n. 1, p. 199–216, 28 dez. 2016.

CASTROAGUDÍN, V.L.; DANELLI, A.L.D.; MOREIRA, S.I.; REGES, J.T.A.; de CARVALHO, G. et al. **The wheat blast pathogen *Pyricularia graminis-tritici* has complex origins and a disease cycle spanning multiple grass hosts**. [s.l.] *Plant Biology*, 16 out. 2017. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/203455>>. Acesso em: 2 abr. 2022.

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

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. D. A. Avaliação de Perdas no Rendimento de Grãos de Trigo Causadas por *Pyricularia grisea*, no Período de 1988 a 1992, em Mato Grosso do Sul. **Boletim de Pesquisa**, n.7. 31p. EMPRABA. 2000.

CERESINI, P. C. et al. Wheat Blast: Past, Present, and Future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 427–456, 25 ago. 2018.

PAGANI, A. P. S.; DIANESE, A. C.; CAFÉ-FILHO, A. C. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. **Phytoparasitica**, v. 42, n. 5, p. 609–617, 1 dez. 2014.

CASTROAGUDÍN, V.L.; CERESINI, P.C.; OLIVEIRA, S.C.; REGES, J.T.; MACIEL, J.L. et al. Resistance to QoI Fungicides Is Widespread in Brazilian Populations of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**®, v. 105, n. 3, p. 284–294, mar. 2015.

OLIVEIRA, S.C.; CASTROAGUDÍN, V.L.; MACIEL, J.L.N.; PEREIRA, D.A.S.; CERESINI, P.C. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 298–304, dez. 2015.

POLONI, N.M.; CARVALHO, G.; VICENTINI, S.N.C. et al. Widespread distribution of resistance to triazole fungicides in Brazilian populations of the wheat blast pathogen. **Plant Pathology**, v. 70, n. 2, p. 436–448, fev. 2021.

VICENTINI, S. N. C., CASADO, P. S., de CARVALHO, G., MOREIRA, S. I., DORIGAN, A. F., SILVA, T. C., et al. Monitoring of Brazilian wheat blast field populations reveals resistance to QoI, DMI, and SDHI fungicides. **Plant Pathology**, v. 71, n. 2, p. 304–321, fev. 2022.

KRETSCHMER, M.; LEROCH M.; MOSBACH A. Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 12, p. e1000696, de dez de 2009.

FISCHER, M.C.; HAWKINS, N.J.; SANGLARD, D.; GURR, S.J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science (New York, N.Y.)**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 18 maio 2018.

OMRANE, S.; SGHYER, H.; AUDÉON, C.; et al. Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 2805–2823, 2015.

WANG, ZQ.; MENG, FZ.; ZHANG, MM.; et al. A Putative Zn₂Cys₆ Transcription Factor Is Associated With Isoprothiolane Resistance in *Magnaporthe oryzae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2608, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02608/full>>. Acesso em: 2 abr. 2022.

PERLIN, Michael H.; ANDREWS, Jared; SAN TOH, Su. Essential Letters in the Fungal Alphabet. In: **Advances in Genetics**. [s.l.]: Elsevier, 2014, v. 85, p. 201–253. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128002711000044>>. Acesso em: 9 abr. 2022.

PAULSEN, I. T.; SLIWINSKI, M. K.; SAIER, M. H. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. **Journal of Molecular Biology**, v. 277, n. 3, p. 573–592, 1998.

SUN, CB.; SURESH, A.; DENG, YZ.; *et al.* A multidrug resistance transporter in *Magnaporthe* is required for host penetration and for survival during oxidative stress. **The Plant Cell**, v. 18, n. 12, p. 3686–3705, 2006.

THOMAS, C.; TAMPÉ, R. Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters. **Annual Review of Biochemistry**, v. 89, p. 605–636, 2020.

ESQUIVEL, B.D.; WHITE, T.C. Accumulation of Azole Drugs in the Fungal Plant Pathogen *Magnaporthe oryzae* Is the Result of Facilitated Diffusion Influx. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1320, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01320/full>>. Acesso em: 2 abr. 2022.

ARZMI, M.H.; DASHPER, S.; CATMULL, D.; *et al.* Coaggregation of *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain dependent. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 5, p. fov038, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fov038>>. Acesso em: 3 abr. 2022.

BRITO, F.S.D.; SANTOS, J.R.P.; AZEVEDO, V.C.R.; *et al.* Genetic Diversity and Azole Fungicide Sensitivity in *Pseudocercospora musae* Field Populations in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00099>>. Acesso em: 2 abr. 2022.

DORIGAN, A.F.; CARVALHO, G.; POLONI, N.M.; *et al.* Resistance to triazole fungicides in *Pyricularia* species associated with invasive plants from wheat fields in Brazil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, n. 1, p. 39332, 2019. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/39332>>. Acesso em: 1 abr. 2022.

GUPTA, S.; COHEN, K.A.; WINGLEE, K.; *et al.* Efflux Inhibition with Verapamil Potentiates Bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 574–576, 2014. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01462-13>>. Acesso em: 2 abr. 2022.

KAATZ, G.W. Bacterial efflux pump inhibition. **Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)**, v. 6, n. 2, p. 191–198, 2005.

PELÁEZ, J.E.M.; VÁSQUEZ, L.E.D.; DÍAZ, T.J.B.; *et al.* Utilización de un ensayo de dilución en microplatos para medir la actividad antifúngica de sustancias contra *Mycosphaerella fijiensis*, MORELET. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, 2006. Disponível

em: <http://www.scielo.org/co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472006000200002&lng=en&nrm=iso&tng=en>. Acesso em: 3 abr. 2022.

TEGOS, G.P.; HAMBLIN, M.R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 196–203, 2006.

TEGOS, G.P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; *et al.* Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3202–3209, 2008.

YU, Q.; DING, X.; ZHANG, B.; *et al.* Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 4, p. 633–641, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/1567-1364.12150>>. Acesso em: 1 abr. 2022.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.