

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE**

**EFICÁCIA DE SAIS IMIDAZÓLICOS SOBRE ESPÉCIES  
MICOTOXIGÊNICAS DE *FUSARIUM SPP.* QUE CONTAMINAM GRÃOS  
DE TRIGO**

**Aícha Daniela Ribas e Ribas  
Bióloga, ênfase em Ecologia de Manejos Silvestres (UNISINOS)  
Mestre em Fitotecnia, ênfase em Fitopatologia (UFRGS)**

Tese apresentada como um dos requisitos à  
obtenção do Grau de Doutor em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente/Ênfase  
em Micologia

**Porto Alegre - RS, Brasil  
Novembro, 2015**

**“Tudo que não puder contar como fez, não faça!”**

***Immanuel Kant***

## **AGRADECIMENTOS**

A virtude do saber é algo divino, mas não sobrenatural, exige muita dedicação, força de vontade e esperança de que no final tudo vai dar certo...

A força que emana sempre, que jamais diminua, continue crescendo servindo de exemplo para quem estiver atento.

Dedico esta obra especialmente ao meu marido Ronaldo de Mello Ribas e minhas amadas filhas Kami e Suri pelo amor, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Ao PPGMAA, Departamento de Fitossanidade/UFRGS e CAPES pelo apoio estudantil, experimental e financeiro.

Ao meu orientador de doutorado Dr. Alexandre M. Fuentesfria que acreditou no meu potencial, e juntamente com o coorientador Dr. Emerson M. Del Ponte me acolheram e passaram os melhores conselhos e ensinamentos possíveis.

A professora Dra. Patricia Valente pelo apoio inestimável.

As minhas colegas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, Bruna Pippi, Vanessa Z. Bergamo e Daiane F. Dalla Lana, meus agradecimentos pelo auxílio na realização dos trabalhos, trocas de conhecimento, parceria e a cima de tudo a amizade.

Ao professor Dr. Henri S. Schrekker e colegas do MUMIC pela parceria e troca de conhecimentos. A todos que participaram de alguma maneira para que tudo ocorresse da forma correta e no prazo esperado.

Aos meus queridos familiares, em especial ao meu irmão Roger pela positividade, a minha irmã Desire Ribas e Sogra Vanda M. Mello, pelo apoio incondicional nas horas de necessidade.

Enfim, aos meus amados pais Antonio C. Ribas e Alcione Ribas, primeiros professores e constantes orientadores da vida, que me ensinaram a ser uma boa cidadã e ter gratidão a todos que me fazem bem.

**EFICÁCIA DE SAIS IMIDAZÓLICOS SOBRE ESPÉCIES  
MICOTOXIGÊNICAS DE *FUSARIUM SPP.* QUE CONTAMINAM GRÃOS DE  
TRIGO**

Autora: Aícha Daniela Ribas e Ribas  
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria  
Co-orientador: Emerson Medeiros Del Ponte

**RESUMO:** Os membros do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) estão entre os mais importantes fungos micotoxigênicos que infectam tecidos florais e interferem no desenvolvimento dos grãos de cereais resultando na redução da produtividade e qualidade dos grãos. Sais imidazólicos (SI) são compostos orgânicos constituídos por um grande cátion orgânico em conjunto com um ânion e alquilo substituintes. Os cátions e ânions constituintes modificam as propriedades químicas e físicas resultando no surgimento de características interessantes destes compostos, que incluem natureza anfífila e baixa toxicidade para as células humanas. Recentemente, SI foram testados contra fungos e bactérias patogênicas para o homem com resultados promissores. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antifúngica de SI contra o CEFG que afetam grãos de trigo. A sensibilidade de *F. graminearum*, *F. asiaticum* e *F. meridionale* foi avaliada frente a três SI, que variaram quanto aos ânions substituintes ( $C_{16}MImCl$ ,  $C_{16}MImMeS$  e  $C_{16}MImNTf_2$ ), e um fungicida comercial (tebuconazol). A avaliação foi realizada com base na germinação dos esporos e na inibição efetiva de 50% do micélio. A concentração inibitória mínima (CIM) variou de 1,56 a 6,25  $\mu g/mL$ , e o CIM mais frequente foi determinado em 3,12  $\mu g/mL$ . Apenas um SI, cloreto de 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio -  $C_{16}MImCl$ , foi capaz de reduzir 50% do crescimento micelial *in vitro* ( $CE_{50}$ ) para todos os isolados, a uma concentração de 0,321 g/L. As curvas de tempo de morte indicaram que o SI  $C_{16}MImCl$  apresenta efeito fungicida significativo na concentração de 12,48  $\mu g/mL$ , com a ação iniciada desde a primeira hora de incubação, que foi mantida durante o desenvolvimento do ensaio. O SI  $C_{16}MImCl$  foi pulverizado sobre as espigas de trigo durante a floração suprimindo com sucesso os sintomas e controlando *F. graminearum* nas espigas e grãos quando aplicado de forma preventiva (antes da inoculação fúngica) e na dose mais elevada (2 g/L), não diferindo do fungicida usual tebuconazol. Os dados sugerem o uso potencial do SI  $C_{16}MImCl$  para o controle do fungo micotoxigênico *F. graminearum* em doenças que afetam o trigo especialmente quando aplicados antes da infecção fúngica.

---

<sup>1</sup> Tese de doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Centro das Ciências da Saúde, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (119p.) Novembro, 2015.

# EFICACY OF IMIDAZOLIUM SALTS AGAINST MYCOTOXIGENIC *FUSARIUM SPP.* AFFECTING WHEAT GRAINS

Author: Aícha Daniela Ribas e Ribas  
Adviser: Alexandre Meneguelo Fuentefria  
Co-adviser: Emerson Medeiros Del Ponte

**ABSTRAT:** Members of the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) are among the most important mycotoxigenic fungi that infect floral tissues and developing kernels of cereal crops, and lead to reduced grain yield and quality. Imidazolium salts (IMSs), are organic compounds composed entirely of a large organic cation together with an anion and alkyl substituents. The cation and/or anion constituents modify the chemical and physical properties which may result in the emergence of interesting properties of these compounds that include an amphiphilic nature, low toxicity to human cells. Recently, IMSs have been tested against fungi and bacteria that are pathogenic to humans with promising results. The aim of this study was to investigate the antifungal activity of imidazolium salts (IMS) against FGSC which affects wheat grains. The sensitivity of *F. graminearum*, *F. asiaticum* and *F. meridionale* isolates to three IMS, which vary in substituent anions ( $C_{16}MImCl$ ,  $C_{16}MImMeS$  and  $C_{16}MImNTf_2$ ), and one commercial fungicide (tebuconazole) was evaluated based on spore germination and mycelial growth inhibition. The minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 1.56 to 6.25  $\mu g/mL$ , with 3.12  $\mu g/mL$  as the most frequent MIC. Only one IMS, 1-n-Hexadecyl-3-methylimidazolium chloride ( $C_{16}MImCl$ ), was able to reduce 50% of the *in vitro* mycelial growth ( $EC_{50}$ ) for all isolates at a concentration of 0.321g/L. The time-kill curves indicated a significant fungicidal effect at the concentration of four times the MIC (12,48  $\mu g/mL$ ), starting since one hour after incubation, which was maintained during the course of the experiment. The IMS  $C_{16}MImCl$  sprayed onto the wheat spikes during flowering successfully suppressed symptoms and control of the disease in the spikes and kernels when applied preventatively (before fungal inoculation) at the highest dosage (2 g/L), not differing from tebuconazole. The data suggests the potential of using an IMS for controlling mycotoxigenic *Fusarium* and the resulting disease affecting wheat, especially when applied prior to fungal infection.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Agricultural Microbiology and the Environment, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (119p.) Novembro, 2015.

## SUMÁRIO

	Páginas
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
2. <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	04
2.1 Nova nomenclatura.....	04
2.2 Importância da doença fusariose da espiga de trigo.....	05
2.2.1 Micotoxinas.....	07
2.3 Patogeno Global.....	10
2.4 Morfologia e estruturas do patógeno.....	12
2.5 Aspectos reprodutivos.....	15
2.6 Ciclo das relações patógeno/hospedeiro.....	20
2.7 Fungicidas Agrícolas – Triazóis.....	23
2.7.1 <i>Fusarium graminearum</i> e a resistência.....	27
2.8 Alternativa de controle - Sais Imidazólicos (SI).....	31
2.8.1 Bioaplicações.....	33
2.8.2 Aspectos de Toxicidade.....	35
2. <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
3.1 Testes <i>in vitro</i> .....	37
3.1.1 Amostras utilizadas para o estudo.....	37
3.1.1.1 Isolados do CEFG.....	37
3.1.1.2 Cultivar de trigo.....	38
3.1.1.3 Fungicida agrícola.....	38
3.1.1.4 Sais Imidazólicos.....	39
3.1.2 Testes de susceptibilidade pela concentração inibitória mínima (CIM) em microplaca de titulação.....	40
3.1.2.1 Diluição dos fungicidas e sais imidazólicos.....	40
3.1.2.2 Preparo do inóculo de fungos filamentosos.....	41
3.1.2.3 Determinação da CIM .....	42
3.1.3 Avaliação de inibição de crescimento micelial em placa de Petri (Concentração efetiva de 50%- CE <sub>50</sub> ).....	42
3.1.4 Ensaio do tempo de morte (Time Kill Assay).....	43
3.2 Testes <i>in vivo</i> .....	44
3.2.1 Análise qualitativa da incidência e severidade em plantas de trigo.....	44
3.2.2 Análise quantitativa da incidência de <i>F. graminearum</i> em grãos de trigo.....	46
3.2.3 Análise da germinação e sinais de fitotoxicidade em sementes sadias expostas ao SI C <sub>16</sub> MImCl.....	47

	Páginas
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 Testes <i>in vitro</i> .....	48
4.1.1 Testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> pela CIM em microplaca de titulação.....	48
4.1.2 Avaliação de inibição de crescimento micelial – CE <sub>50</sub> ....	52
4.1.3 Ensaio sobre a curva de morte.....	55
4.2 Testes <i>in vivo</i> .....	58
4.2.1 Análise qualitativa da incidência e severidade em plantas de trigo inoculadas .....	58
4.2.2 Análise quantitativa de incidência da doença em grãos de trigo inoculados .....	62
4.2.3 Análise de germinação em sementes tratadas com o sal imidazólico SI C <sub>16</sub> MImCl.....	65
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>77</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>78</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Páginas
1. Formas reprodutivas de <i>Fusarium graminearum</i> . 1) O fungo cresce como uma colônia de hifas haplóides, com exceção de breves hifas dicarióticas e diploidias, precedentes a meiose e produção de haploidia, 2) Fase Meiópórica: a) Peritécios Homotáticos são capazes de auto-fertilizar produzindo ascósporos clonais (apomixis); b) Peritécios Heterotáticos são auto-estéreis necessitam de um mating tipe compatível para fertilização, produzem ascosporos recombinantes; 3) Fase Mitótica: Os esporos assexuais (c) macroconídios são produzidos por mitose em hifas haplóides em massas agregadas de (d) esporodoquios.....	16
2. Monociclo de <i>Fusarium graminearum</i> em trigo A) Sobrevivência (garante a viabilidade do fungo em situações adversas); B) Disseminação: Propágulos que partem da fonte de inóculo e atingem o tecido suscetível sadio (liberação, dispersão e deposição); C) Infecção: Os ascosporos/ macroconídios depositam-se sobre as anteras, germinam, e pelo filete atingem o ovário D) Colonização: Fase parasitária do patógeno, invasão e exploração nutricional do hospedeiro; E) Reprodução: Produção do inóculo sobre as glumas do hospedeiro (macroconídios), mais tarde peritécios em tecidos senescidos. F) Colheita: armazenagem de sementes infectadas, micotoxinas.....	20
3. Estrutura química do Sal Imidazólico 1-Dodecyl-3-methylimidazolium chloride.....	31
4. Estrutura do fungicida tebuconazol utilizado neste trabalho.....	39
5. Variações dos ânions constituintes dos sais imidazólicos utilizados neste estudo.....	39
6. Imagem dos esporos tratados com C <sub>16</sub> MImCL apresentando ausência de germinação na CIM de 3,12 µg/mL.....	48
7. Visualização do processo de germinação ao crescimento micelial sob a ação do SI C <sub>16</sub> MImCl. (A) Emissão do tubo germinativo partindo dos esporos, (B) grande parte dos esporos em germinação com o início crescimento micelial, (C) crescimento micelial com a presença de esporos em germinação e (D) grande quantidade de micélio e poucos esporos em germinação.....	49

8.	Concentração inibitória mínima de <i>Fusarium asiaticum</i> com o SI C <sub>16</sub> MImCl.....	50
9.	Frequência da concentração inibitória mínima (CIM), valores que inibiram a germinação de três membros do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> (Fasi = <i>F. asiaticum</i> ; Fgra = <i>F. graminearum</i> ; Fmer = <i>F. meridionale</i> ).....	51
10.	Teste de crescimento micelial com o fungicida tebuconazol. A) estemunha sem adição de fungicida. B) Ausência do crescimento micelial na menor dose de 0,4 g/L.....	53
11.	Crescimento micelial (A) <i>Fusarium graminearum</i> , (B) <i>F. asiaticum</i> e (C) <i>F. meridionale</i> .....	54
12.	Média observada (símbolos) e valores ajustados (linhas) modelo log-ajustado para a resposta do crescimento micelial de três membros do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> , para doses crescentes de três sais imidazólicos e um fungicida comercial (tebuconazol). A estimativa de CE (dose eficaz que reduz de 50% do crescimento micelial), foi obtida somente por C <sub>16</sub> MImCl (0,316) e tebuconazol (0,006).....	55
13.	Tempo de morte de <i>Fusarium asiaticum</i> nas concentrações da testemunha (sem tratamento), CIM (3,12 µg/mL), 2xCIM (6,24 µg/mL) e 4xCIM (12,48 µg/mL), em três diluições em 24 horas (A) e 48 horas (B).....	56
14.	Tempo de morte de <i>Fusarium meridionale</i> nas concentrações da testemunha (sem tratamento), CIM (3,12 µg/mL), 2xCIM (6,24 µg/mL) e 4xCIM (12,48 µg/mL), em três diluições em 24 horas (A) e 48 horas (B).....	56
15.	Tempo de morte de <i>Fusarium graminearum</i> nas concentrações da testemunha (sem tratamento), CIM (3,12 µg/mL), 2xCIM (6,24 µg/mL) e 4xCIM (12,48 µg/mL), em três diluições em 24 horas (A) e 48 horas (B).....	57
16.	Curva de crescimento e morte: (A) <i>Fusarium asiaticum</i> ; (B) <i>F. meridionale</i> e (C) <i>F. graminearum</i> ; (ST) Sem tratamento; (Fasi, Fmer, Fgram), CIM, (3,12 µg/mL), 2xCIM (6,24 µg/mL) e 4xCIM (12,48 µg/mL), tratadas com o Sal imidazólico C <sub>16</sub> MImCl.....	58

<b>17.</b> Experimento em casa de vegetação com plantas de trigo apresentando sintomas d da fusariose da espiga de trigo .....	59
<b>18.</b> Sintomas de Fusariose da espiga de trigo.....	59
<b>19.</b> Médias e respectivos intervalos de confiança de 95% (n = 5) expressos em percentual de redução na incidência da doença (A), severidade (B) em relação ao controle não tratado (100 % doença), por um SI (C <sub>16</sub> MImCl), e fungicida tebuconazol aplicados em duas dosagens (0,5 ou 2 g/L) antes (preventiva) e após (curativa) e inóculo de <i>Fusarium graminearum</i> .....	62
<b>20.</b> Grãos trilhados das plantas de trigo, separados conforme o tratamento.....	63
<b>21.</b> A) Incubação de grãos de trigo infectados provenientes da testemunha que não recebeu nenhum tratamento fungicida e B) Grãos provenientes de plantas de trigo que receberam como tratamento o fungicida tebuconazol.....	63
<b>22.</b> Sementes germinadas em câmara úmida. (A) Tratamento Curativo SI-Cl 2 g/L, (B) Tratamento Curativo Si-Cl 0,5 g/L, (C) Tratamento Preventivo tebuconazol 0,5 g/L e (D) Tratamento Preventivo tebuconazol 2 g/mL.....	64
<b>23.</b> Médias e respectivos intervalos de confiança de 95% (n = 5) expressos em percentual de redução de grãos infectados em relação ao controle não tratado (100% doença). Tratados com SI (C <sub>16</sub> MImCl), e o fungicida aplicados em duas dosagens (0,5 ou 2 g/L) antes (preventiva) e após (curativa), inóculo de <i>Fusarium graminearum</i> .....	65
<b>24.</b> Análise de germinação (A) sementes tratadas com SI C <sub>16</sub> MImCl, (B) sementes sem nenhum tratamento.....	67
<b>25.</b> Presença de contaminantes durante a germinação das sementes não tratada (A) e Ausência de contaminantes nas sementes tratadas com o SI-Cl (B).....	68

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Páginas
1. Classificação química dos principais fungicidas triazóis e mecanismo de ação envolvidos na interrupção dos processos vitais dos fungos fitopatogênico, adaptado (FRAC, 2007).....	25
2. DMI's fungicidas e a resistência de fungos fitopatogênicos.....	30
3. Informações sobre os isolados do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> utilizados neste estudo.....	38
4. Informação química dos três sais imidazólicos testados para supressão das espécies de <i>Fusarium</i> que afetam culturas de cereais.....	40
5. Valores médios da concentração inibitória mínima (CIM) para dois sais imidazólicos e um fungicida químico que suprimiram o crescimento de isolados representantes de três membros do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> .....	52
6. Controle <i>in vivo</i> de <i>Fusarium graminearum</i> com aplicações preventiva e curativa em duas dosagens do C <sub>16</sub> MImCl e tebuconazol.....	60
7. Médias de percentual de germinação que apresentaram influência significativa (teste de "t" de student, p<0,05) em relação a cada tratamento.....	66

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**BDA** - Agar batata dextrose

**Br** - Bromo

**Cl** - Cloro

**C+** - Controle positivo

**CEFG** - Complexo de espécies *Fusarium graminearum*

**CLSI** - Clinical And Laboratory Standards Institute

**CIM** - Concentração inibitória mínima

**CE<sub>50%</sub>** - Concentração efetiva de 50%

**CM** - Crescimento Micelial

**DMIs** - Inibidores de Desmetilação

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DON** - Desoxinivalenol

**FRAC** - Fungicide Resistance Action Committee

**LI** - Líquidos Iônicos

**MDR** - Resistência a Múltiplas Drogas

**MTT** - Brometo de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

**NPK** - Nitrogênio, Fosforo e Potássio

**NIV** - Nivalenol

**SI** - Sais Imidazólicos

**SNA** - Synthetic nutrient- poor Agar

**ST** - Sem Tratamento

**UFC** - Unidade Formadora de Colônia

**RPMI** - Meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

## 1 INTRODUÇÃO

A ascensão populacional global indica que até 2050 a população deva atingir 9 bilhões de pessoas. Para atender a uma crescente demanda por alimentos tornou-se necessário a busca de inúmeras tecnologias que visam combater alguns fatores que são limitantes à produção agrícola mundial, entre eles estão às doenças causadas por fungos fitopatogênicos.

O controle de doenças de plantas por fungicidas é uma das tecnologias mais empregadas, possuindo papel em alguns casos de agente necessário e catalisador do processo produtivo rural. As culturas do trigo, arroz e milho estão entre os cereais que fornecem as matérias-primas mais utilizadas para fins alimentícios. Em função da composição nutricional peculiar tornam-se suscetíveis ao ataque de fungos durante todo o ciclo de vida, antes e após a colheita, ocasionando perdas econômicas e nutricionais dos produtos obtidos.

No Brasil, os fungicidas são utilizados como principal alternativa para o aumento do potencial produtivo da cultura do trigo. Porém, o controle químico pode não ser efetivo devido ao longo período de suscetibilidade da cultura, bem como à dificuldade da aplicação dos fungicidas usuais no local específico. A

fusariose da espiga, causada por *Fusarium graminearum* *sensu lato* Schwabe é, atualmente, uma das mais importantes doenças da cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) no mundo.

As principais dificuldades relacionadas ao controle químico da fusariose da espiga do trigo com os fungicidas incluem a esporadicidade de sua ocorrência, dificuldade de aplicar os fungicidas no momento correto, e a dificuldade de atingir os sítios de infecção (as anteras).

O demasiado emprego de fungicidas na tentativa do controle de doenças fungicas tem acarretado além da poluição do meio ambiente e a toxicidade aos humanos, a possibilidade da seleção de estirpes resistentes em populações ambientais. A fim de evitar tais prejuízos tornou-se necessário a utilização de estratégias múltiplas e integradas.

Os Sais imidazólicos (SI), substâncias constituídas por um ânion e um cátion orgânico contendo uma unidade imidazólica, possuem ação antimicrobiana, e constituem uma área emergente e em crescimento atualmente.

A possibilidade de manipulação dos diferentes íons faz com que estas moléculas sejam maleáveis quanto ao seu estado físico e químico. Estas variações estruturais possibilitam o ajuste de características conforme a função desejada, podendo ser aplicadas em diversas áreas, incluindo as bio-aplicações.

Considerados atóxicos em sua maioria, não apresentam volatilidade e inflamabilidade, possuem estabilidade química e térmica, podem ser recicláveis e não promovem emissões poluentes. Devido a estas características relevantes,

têm sido apontados como alternativa viável dentro do conceito “química verde”, visto a necessidade de substituição de substâncias usuais tóxicas e poluentes.

Resultados promissores foram verificados quando testados como antimicrobianos, apresentando excelente resposta de atividade em bactérias, leveduras e fungos filamentosos de origem médica.

Portanto, a justificativa deste trabalho é fundamentada na dificuldade de aliar controle químico de baixa toxicidade com baixos níveis de micotoxinas. Os poucos fungicidas recomendados apresentam alta toxicidade para o homem e o meio ambiente. Ainda possuem histórico de resistência em outras espécies de importantes fungos fitopatogênicos, além disso, relatos de isolados de *F. graminearum* apresentando baixa sensibilidade já foram registrados inclusive no Rio Grande do Sul.

A presente tese teve como objetivo avaliar o efeito de três sais imidazólicos na inibição da germinação de macroconídios, concentração efetiva que inibe 50% do crescimento micelial, estabelecer concentrações fungicidas e o tempo de morte de três espécies micotoxigênicas do complexo de espécies *Fusarium graminearum*.

Bem como, testar e comparar com um fungicida químico padrão, a eficácia do SI que mostrar a melhor performance *in vitro*, na supressão de *Fusarium graminearum* agente fitopatológico de doença em plantas de trigo, inoculadas com o agente patogênico, antes ou após a aplicação do SI em diferentes doses.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Nova nomenclatura

O fungo *Fusarium graminearum*, (Schwabe) é classificado como um ascomiceto (Sordariomycetes: Hypocreales:Nectriaceae) (Sutton, 1982; Leslie & Summerel, 2006), cujo estágio meiospórico era conhecido até recentemente como *Gibberella zea*,(Schwainitz) Petch.

Atualmente, a nomenclatura dos fungos em geral, passou por rigorosas mudanças de acordo com Código Internacional de Nomenclatura de algas, fungos e plantas, que indica o uso de apenas um nome para cada espécie de fungo, independente da forma sexual.

Seguindo os critérios da comunidade científica, o nome da espécie selecionada como representante, tanto da fase mitospórica (assexuada) como a meiospórica (sexuada) foi *Fusarium graminearum* (Geiser et al., 2013). E conforme designado, este trabalho seguirá a nova nomenclatura, e também não mais tratará como nome doença a giberela, e sim, fusariose da espiga de trigo.

## 2.2 Importâncias da doença fusariose da espiga de trigo

O trigo é um dos cereais mais cultivados no mundo, com significativo peso na economia global. Apresentou em 2015 uma produção mundial estimada em 720 milhões de toneladas, onde grande parte desta produtividade foi oriunda da Europa (20,4%), China (17,5%), Índia (13,1%) e EUA (7,8%) (FAO, 2015).

O Brasil contribuiu em 2015, com 7 milhões de toneladas de grãos, representando 0,97% do total produzido mundialmente (CONAB, 2015).

A demanda alimentar do trigo no Brasil representa 95% do consumo total, a qual deve continuar aumentando, totalizando 11 Mt em 2024, 4% maior do que a média. Com uma população em crescimento, o resultado é uma ligeira redução no consumo per capita. (FAO, 2015).

A produção de trigo pode sofrer a interferência de vários fatores, mas em particular, a fusariose da espiga de trigo que vêm impactando seriamente a produção dos cereais (Astolfi et al., 2011; McMullen et al., 2012; Gilbert & Harber, 2013).

Epidemias frequentes na cultura do trigo têm sido observadas nos últimos anos em diversas regiões do mundo promovendo danos na produtividade e na qualidade dos grãos (Del Ponte et al., 2004; Starkey et al., 2007; Nielsen et al., 2011).

A fusariose da espiga de trigo tem como agente etiológico, membros do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) que infectam os tecidos do trigo (*Triticum aestivum*), aveia (*Avena sativa*), cevada (*Hordeum*

*vulgare*) arroz (*Oryza sativa*) e podridão do colmo do milho (*Zea mays*), reduzindo a qualidade dos grãos (McMullen et al., 2012).

No Brasil, entre as décadas de 70 e 80, a doença se manifestava de forma branda, causando prejuízos esporádicos, como nas safras de 1957, 1975 e 1982 (Reis et al.,1996). Mas, a partir da década de 90, com as mudanças climáticas, e práticas culturais, a doença alcançou níveis epidêmicos principalmente nas regiões da porção sul (Del Ponte et al., 2004; Del ponte et al., 2009).

As últimas epidemias relatadas nos anos de 1997, 1998, 2000, 2002 e 2009, anos de elevada precipitação pluvial, indicaram danos médios variados que chegaram próximos a 40%, elevando o status para uma das mais preocupantes doenças da região tritícola (Panisson et al., 2003a; Casa et al., 2004; Del ponte et al., 2009).

Essa doença causa danos diretos no rendimento da lavoura como o abortamento de flores ou formação de grãos chochos, enrugados de baixo peso e reduzida densidade (Reis, 1988; Parry et al.,1995).

No entanto, os danos ocasionados pela doença vão além das perdas de produtividade. Atualmente, os danos indiretos, relacionados a qualidade nutricional dos grãos remanescentes (redução de amido, proteínas, celulose e hemicelulose) (Dexter & Nowicki, 2003), qualidade inferior da semente, (baixo poder germinativo e vigor) (Ramos et al., 2014) e a produção de micotoxinas, são fatores preocupantes que elevam o status da doença (Desjardins et al.,1996; Yoshida & Nakajima, 2010).

### **2.2.1 Micotoxinas**

As espécies do CEFG estão entre os mais importantes fungos micotoxigênicos que acometem os cereais (Del Ponte et al., 2007; McMullen et al., 2012). São capazes de produzir toxinas durante a infecção e colonização das plantas, se acumulando nos grãos maduros (Yoshida & Nakajima, 2010).

A produção de micotoxinas sofre influência principalmente das condições (níveis de dióxido de carbono, oxigênio, composição do substrato, inseticidas e fungicidas), de fatores biológicos (variedade vegetal, estresse, insetos, carga de esporos), e de condições físicas (danos mecânicos, umidade, temperatura) (Prandini et al., 2008; Nesic et al., 2014).

Micotoxinas do tipo tricotecenos indicam um significativo risco a saúde humana e animal devida a inibição da síntese de proteínas nas células eucarióticas, e alterações nas funções imunológicas (Bottalico & Perrone, 2002; Goswani & Kistler, 2004; Zinedine et al., 2007).

Isolados do CEFG que causam fusariose da espiga de trigo produzem variantes quanto ao fenótipo químico (quimiotipo) em relação aos tricoteceno-B e uma micotoxina estrogênica chamada zearalenona (Desjardins, 2008).

Baseados na estrutura química, (quimiotaxia) incluindo a posição de acetilação, três quimiotipos B tricotecenos foram identificados: DON - 3-acetil-desoxinivalenol- (quimiotipo 3-AcADON), DON - 15-acetil-desoxinivalenol

(quimiotipo 15-AcDON), e NIV - nivalenol (quimiotipo NIV), (Miller et al.,1991; Ward et al.,2002; Moss & Thrane, 2004; Astolfi et al.,2011).

DON é o mais prevalente das micotoxinas nos cereais e foi reconhecido como um fator de virulência durante a patogênese (Desjardins et al.,1996). Recentemente, diferenças entre quimiotipos indicaram que 3-AcADON demonstrou maior agressividade na fase patogênica e maior produção total de DON em relação a 15-AcADON em plantas de trigo (Puri & Zhong, 2010).

O DON é um potente inibidor da biossíntese de proteínas que afetam o sistema digestivo em humanos e animais, quando ingeridos em grande quantidade (Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

Níveis de DON são regulados para o abastecimento de alimentos em muitos países; por exemplo, a Comunidade Européia limita os níveis de DON a  $0,5 \text{ mg/Kg}^{-1}$  para os cereais. Os Estados Unidos e Japão limita níveis de DON para  $1 \text{ mg/Kg}^{-1}$  para os produtos acabados destinados ao consumo humano (Conselho de Ciência e Tecnologia de 2003 Agrícola; Buerstmayr et al., 2009).

Os limites para as micotoxinas no Brasil são estabelecidos pela ANVISA. Os valores atuais de DON foram determinados em 1,5 e 1,25 mg/Kg para trigo não processado e processado, respectivamente. A partir de 2016 os valores vigentes passarão para 1 e 0,75 mg/Kg, conforme o tipo de amostra de trigo. Para a micotoxina ZEA, os limites também são determinados para amostras de trigo e derivados, e passarão para 0,2 a 0,1 mg/Kg. No Brasil,

para NIV, atualmente, não há limites determinados (Anvisa, resolução –RDC, N 7, 18 de fevereiro de 2011).

Um levantamento de dados em larga escala indicou que DON e NIV estão presentes em 57% e 16%, respectivamente, das amostras de alimentos recolhidos na União Europeia (Schothorst & Egmond, 2004).

Métodos moleculares têm sido usados para genotipar isolados, pela presença de alelos de genes relacionados à síntese dessas micotoxinas (O'Donnell et al., 2008).

Ambas as micotoxinas DON e NIV são sintetizadas principalmente por enzimas e reguladoras codificadas pelos genes (*TRI*) localizados no cluster gênico de tricotecenos (Desjardins, 2006). As diferenças na estrutura química entre DON e NIV, devem-se a presença ou ausência de um grupo hidroxila na posição (C4) originando-se a partir de variações de nucleótidos nos dois genes *TRI* (*TRI13* e *TRI7*) (Lee et al., 2002).

A NIV é conhecida por ser mais tóxica do que o DON (Eriksen et al., 2004), exercendo um efeito sinérgico quando misturado com DON (Sobrova et al., 2010). Porém, isolados de *F. graminearum* e *F. asiaticum* diferem quanto a quantidade produzida de cada tricoteceno DON e NIV (Sobrova et al., 2010).

A zearalenona é um metabólito secundário, envolvido no controle da reprodução sexuada do *F. graminearum*, e quando ingerido em rações por alguns animais, provoca efeitos estrogênicos (Zinedine et al., 2007). A redução

química da zearalenona produz o derivado zearalenol, que possui efeito anabolizante em bois e ovelhas (Martins & Kemmelmeier, 1993).

Recentemente, a presença de *F. graminearum* em milho resultou em altos níveis de zearalenona e outras micotoxinas em grãos para produção de etanol e ração para alimentar o gado e suínos (Wu & Munkvold, 2008).

### **2.3 Patógeno global**

Existem mais de 1500 registros na literatura de espécies, *formae speciales* e variedades do fungo filamentosso *Fusarium* spp. (Index Fungorum, 2015, Mycobank, 2015).

Este gênero pode estar presente no solo, ar ou serem veiculados por sementes, sendo responsável por inúmeras doenças em homens, animais e plantas, danos de produtividade em várias culturas, além de apresentar micotoxicidade (Leslie & Summerell 2006; Summerell et al., 2010).

Entre os fitopatogênicos destacam-se o *Fusarium graminearum* sensu lato (teleomorph: *Gibberella zaeae* (Schwein) Petch) considerado o mais importante agente etiológico da fusariose da espiga de trigo e em várias culturas de cereais em todo o mundo (Goswani & Kistler, 2004).

Anteriormente a aplicação de análises de genotipagem assumia-se que *F. graminearum* era uma única espécie-panmítica (Taylor et al., 2000). No entanto, a análise filogenética das sequências de DNA revelaram que esta morfoespécie compreende pelo menos 15 espécies filogeneticamente distintas e biogeograficamente estruturadas (Sarver et al., 2011; Wang et al., 2011).

Designadas coletivamente como complexo de espécies *F. graminearum* (CEFG) (Smith & Seddon, 1998), compreendem, as espécies, *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. boothii*, *F. mesoamericanum*, *F. acaciae – mearnsii*, *F. asiaticum*, *F. graminearum sensu stricto*, *F. cortaderiae*, *F. brasilicum*, *F. gerlachii*, *F. vorosii*, *F. aethiopicum*, *F. ussurianum* (O'Donnell et al., 2000; O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007; O'Donnell et al., 2008; Yli-Mattila et al., 2009), *F. louisianense* e *F. nepalense* (Sarver et al., 2011).

Embora morfológicamente indistintas, variam em aspectos relacionados a patogênese e potencial toxigênico, bem como sua distribuição geográfica (Astolfi et al., 2011).

Uma hipótese biogeográfica sugere que a maioria das espécies basais dentro do CEFG pode ser endêmica para o hemisfério sul, enquanto as espécies derivadas evoluíram no hemisfério norte (Starkey et al., 2007).

De acordo com as pesquisas, *F. meridionale*, *F. austroamericanum*, *F. cortaderiae*, e *F. brasilicum* parece ser endêmico da América do Sul (Starkey et al., 2007; Sampietro et al., 2011); *F. acaciae-mearnsii* da Austrália, *F. asiaticum*, *F. vorosii* e *F. ussurianum* da Ásia (O'Donnell et al., 2004); *F. aethiopicum* da África (O'Donnell et al., 2008); *F. boothii* e *F. mesoamericanum* da América Central (O'Donnell et al., 2004; O'Donnell et al., 2008); *F. gerlachii*, *F. louisianense* dos EUA (Starkey et al., 2007), *F. nepalense* do Nepal (Sarver et al., 2011).

*Fusarium graminearum sensu stricto* é cosmopolita na distribuição e foi encontrado na Ásia, África, América, Europa e Oceania. (O'Donnell et al.,

2000; O'Donnell et al., 2004; Láday et al., 2004, Ramirez et al., 2007, Lee et al., 2009; Desjardins et al., 2011).

No sul do Brasil *F. graminearum* sensu stricto, é (> 90%) predominante dentre as espécies a afetar o trigo, seguido por *F. meridionale* (Astolfi et al., 2012). Baseado em análises por PCR, *F. graminearum* apresentou genótipo tricoteceno 15-AcADON, enquanto que *F. meridionale* têm apresentado genótipo tricoteceno-15-AcDON, e NIV (Astolfi et al., 2011; Spolti et al., 2012a; Astolfi et al., 2012).

A análise de amostras de grãos de trigo provenientes de lavouras comerciais do Rio Grande do Sul indicou a ocorrência das micotoxinas DON e nivalenol em 59 das 66 amostras, com concentrações médias iguais a  $540\mu\text{g kg}^{-1}$  e  $337\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Observou-se também alta correlação de ocorrência das micotoxinas quando analisadas em conjunto. Evidenciando que ambas as micotoxinas estão sendo produzidas nos grãos de trigo (Del Ponte et al., 2012).

#### **2.4 Morfologia e estruturas do patógeno**

Os peritécios são estruturas de sobrevivência que são produzidas na fase meiospórica, a partir do estroma (Leplat et al., 2013).

Possuem em condições naturais a coloração púrpura-escura a preto brilhante, de formato ovóide e papilado, com diâmetro de 150-350  $\mu\text{m}$  (Hallen & Trail, 2008, Cavinder et al., 2012).

Estas estruturas são constituídas por vários tipos de tecidos produzidos em etapas específicas do desenvolvimento, tendo início com a formação das hifas binucleadas, seguida pela parede exterior, paráfises (micélio estéril que ocupam o centro do peritécio até os ascos desenvolverem), ascos, e os ascósporos (Trail & Common, 2000).

O desenvolvimento de cada um destes tecidos é separado por cerca de 24 horas e têm sido a base de estudos de transcriptoma durante desenvolvimento (Qi et al., 2006).

A expressão gênica das cinco fases do desenvolvimento durante a maturação dos peritécios inclui 2000 genes identificados apenas durante o desenvolvimento sexual, sendo 175 exclusivos para *F. graminearum* (Hallen et al., 2008). As ascas, possuem forma clavada 8-11 x 60-85 mm, contendo 8 ascosporos que variam de hialinos a coloração castanha, levemente curvados e arredondados nas extremidades, medindo de 3-5 x 17-25 mm, apresentando 0 a 4 septos (Booth, 1971).

Os macroconídios, estruturas de reprodução assexuada, são multicelulares, mas contém apenas um núcleo que é descendente mitótico de um núcleo progenitor sendo assim idêntico (Puhalla, 1981). São produzidas por células denominadas de fíalides, curtas de 3,5-4,5 x 10-14 mm, quando agrupadas formam massas em formato de almofadas conhecidas como esporodóquios.

Os macroconídios possuem formato alantóides medindo 2,5-5 x 35-63 mm, portando normalmente de 3 a 7 septos. São encontrados em restos

culturais, em espigas infectadas ou levados pelo vento, em cores que variam de laranja, rosa, cinza, ao castanho (Leplat et al., 2013).

Os primeiros estágios do desenvolvimento da germinação dos macroconídios iniciam após 2h, em meio adequado, com a intumescência do esporos, seguido pela emergência do tubo germinativo e alongamento dos conídios em 8h, finalizando com a ramificação das hifas em 24h (Seong et al., 2008).

As mudanças nas fases do desenvolvimento germinativo envolvem a expressão de mais de 5000 genes em cada fase, sendo a grande maioria não específica. O entendimento nas mudanças de expressão gênica das diferentes fases torna-se um importante passo para a interferência nos processos vitais da germinação do esporo (Seong et al., 2008).

Os clamidosporos são estruturas globosas medindo de 10-12  $\mu$ m de diâmetro, simples ou em cadeia, com a parede espessa, geralmente presentes no solo (Booth, 1971).

O estado vegetativo (hifas) de *F. graminearum* no meio ambiente apresenta coloração que varia de amarelo claro, creme a marrom claro. Em meio de cultura agar batata-dextrose são predominantemente rosa-avermelhada, apresentando hifas de 3,5 x 10-14  $\mu$ m (Booth, 1971).

As hifas de *F. graminearum* apresentam diferenciação morfológica durante o processo de colonização da planta de trigo (Ribichich et al., 2000; Wanyoike et al., 2002). Hifas haploides jovens, as mais freqüentemente observadas, são finas, regularmente septadas e colonizam o sistema vascular, a

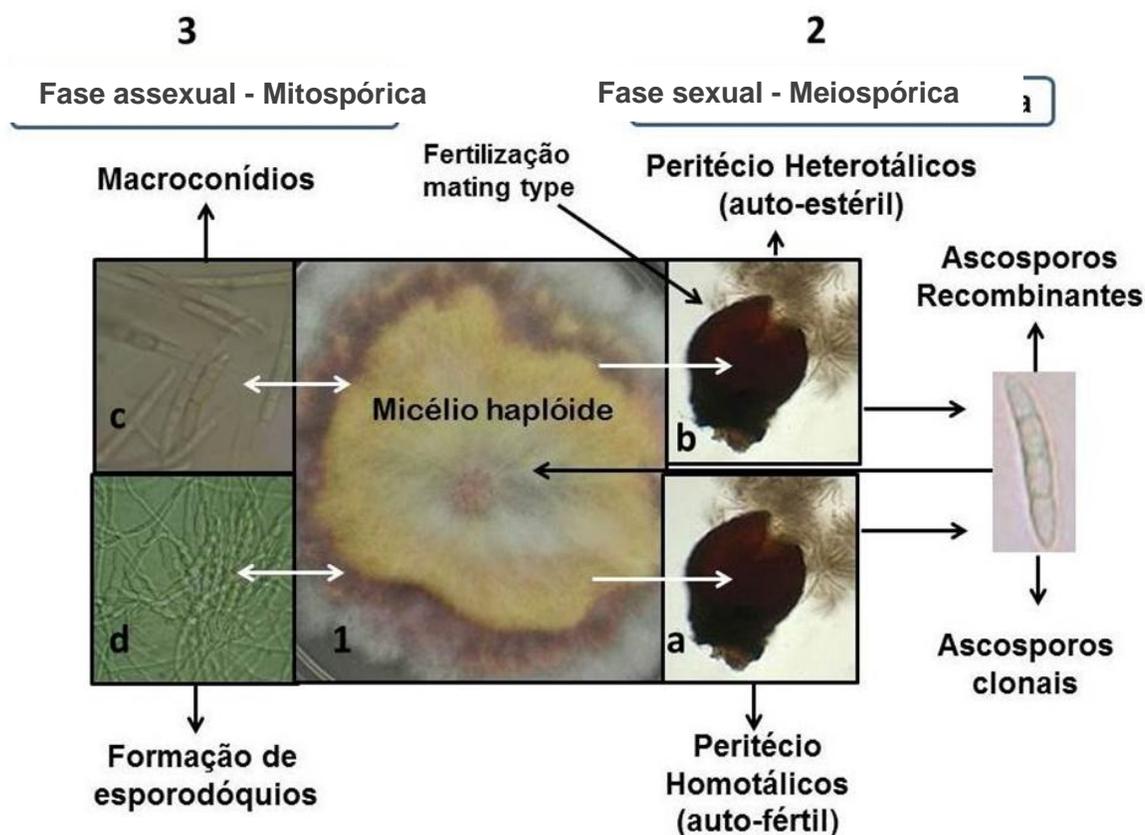
medula e posteriormente o tecido do caule radialmente (Guenther & Trail, 2005). As hifas dicarióticas possuem células mais largas as quais dão origem a peritécios e desenvolvem-se em duas fases distintas de colonização, inicialmente no xilema, em prol do crescimento de hifas radiais, e no colênquima, em apoio ao desenvolvimento de peritécios (Guenther & Trail, 2005).

### **2.5 Aspectos reprodutivos**

No encontro de colônias entre isolados diferentes ou iguais, podem ocorrer compatibilidade sexual (reprodução sexual) fase meióspórica, compatibilidade vegetativa (heterocariose compatível) ou incompatibilidade vegetativa (Glass et al., 2000) (Figura 1).

Anastomoses de hifas permite a troca do conteúdo celular entre indivíduos diferentes (Glass et al., 2000). Sendo este evento requerido em reações de compatibilidade, início da reprodução sexual, formação de heterocariose e ciclo parassexual (Glass et al., 2000; Hicke et al., 2002).

A variabilidade sexual pode ser gerada assexuadamente através da parassexualidade, um mecanismo não sexual de transferência de material genético sem meiose ou sequer desenvolvimento de estruturas sexuais (Chen et al., 2007a).



**FIGURA 1.** Formas reprodutivas de *Fusarium graminearum*. 1) O fungo cresce como uma colônia de hifas haplóides, com exceção de breves hifas dicarióticas e diploidias, precedentes a meiose 2) Fase Meiópórica: a) Peritécios Homotáticos são capazes de auto-fertilizar produzindo ascósporos clonais (apomixis); b) Peritécios Heterotáticos são auto-estéreis necessitam de um mating tipe compatível para fertilização, produzem ascosporos recombinantes; 3) Fase Mitótica: Os esporos assexuais (c) macroconídios são produzidos por mitose em hifas haploides em massas agregadas de (d) esporodóquios.

Neste ciclo, indivíduos fisiologicamente distintos, mas pertencentes ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (GCV), produzem heterocariontes estáveis, através de anastomose de hifas (Chen et al., 2007a).

A GCV é regulada por múltiplos locos de incompatibilidade vegetativa, vic ou het. No encontro de fungos vegetativamente compatíveis, as hifas podem fazer contato, fusão e formação de heterocariose que, em muitos casos, ocorre quando alelos idênticos existem em cada locus vic ou het (Puhalla, 1985). Apenas estirpes compatíveis, de relação clonal, passam por recombinação parassexual produzindo heterocariontes estáveis entre si, onde ocorre fusão nuclear e crossing-over mitótico. O retorno ao estado haplóide ocorre pela formação de aneuploides por erros mitóticos e perda cromossomal (Klittich & Leslie, 1988).

Por outro lado o desenvolvimento meióspórico (sexual) inicia com a formação de hifas com células binucleadas, fase dicariótica com o pareamento de dois núcleos geneticamente distintos que permanecem juntos formando novas células (Bowden & Leslie, 1999).

As células binucleadas desenvolvem as células iniciais dos corpos de frutificação, denominados peritécios (Trail & Comuns, 2000). Os peritécios podem ser heterotálicos, os quais requerem um parceiro compatível para a reprodução sexual (Bowden & Leslie, 1999).

Em condições laboratoriais a recombinação sexual foi observada com um nível moderado de cruzamento (Bowden & Leslie, 1999). Em campo, a recombinação foi inferida, a partir de uma alta diversidade de genótipo usando um ou mais marcadores moleculares (Zeller et al., 2003).

Os peritécios homotáticos, diferentemente dos heterotáticos são capazes de se reproduzir sem um parceiro sexual distinto, produzindo esporos sexuais (ascósporos) com dois núcleos, células binucleadas geneticamente idênticas, representando a maioria dos indivíduos na natureza. (Nelson et al. 1983; Yun et al. 2000).

A quantidade e distribuição de heterogeneidade genética nas populações de campo do fungo sugerem que a reprodução por homotalismo ocorra a uma taxa significativa (Walker et al., 2001).

Para a distinção de peritécios homozogóticos de heterozigóticos, utiliza-se marcadores genéticos como cor, mutantes resistentes a antibióticos, e a uma variedade de mutantes auxotróficos, que são essenciais para a diferenciação, (Pilgeram & Henson, 1992).

A habilidade sexual de *F. graminearum* é devido à presença de genes *MAT* com duas alternativas de idiomorfos *MAT1-1* e *MAT1-2* (Yun et al., 2000). Indivíduos heterotáticos apresentam os dois idiomorfos residindo em núcleos diferentes. Em contraste, os homotáticos carregam ambos *MAT1-1* e *MAT1-2* em um único núcleo, geralmente intimamente ligados (Debuchy & Turgeo, 2006).

A retirada de um dos idiomorfos em indivíduos homotáticos, resulta na transformação de uma linhagem auto-estéril, que só se reproduz se uma linhagem cruzar com outra (Lee et al., 2003).

As espécies do CEFG respondem diferentemente aos mecanismos reprodutivos sexuais, indivíduos homotáticos de *F. graminearum* sensu stricto exibem alta taxa de autofecundação (Trail et al., 2002). Enquanto que, *F.*

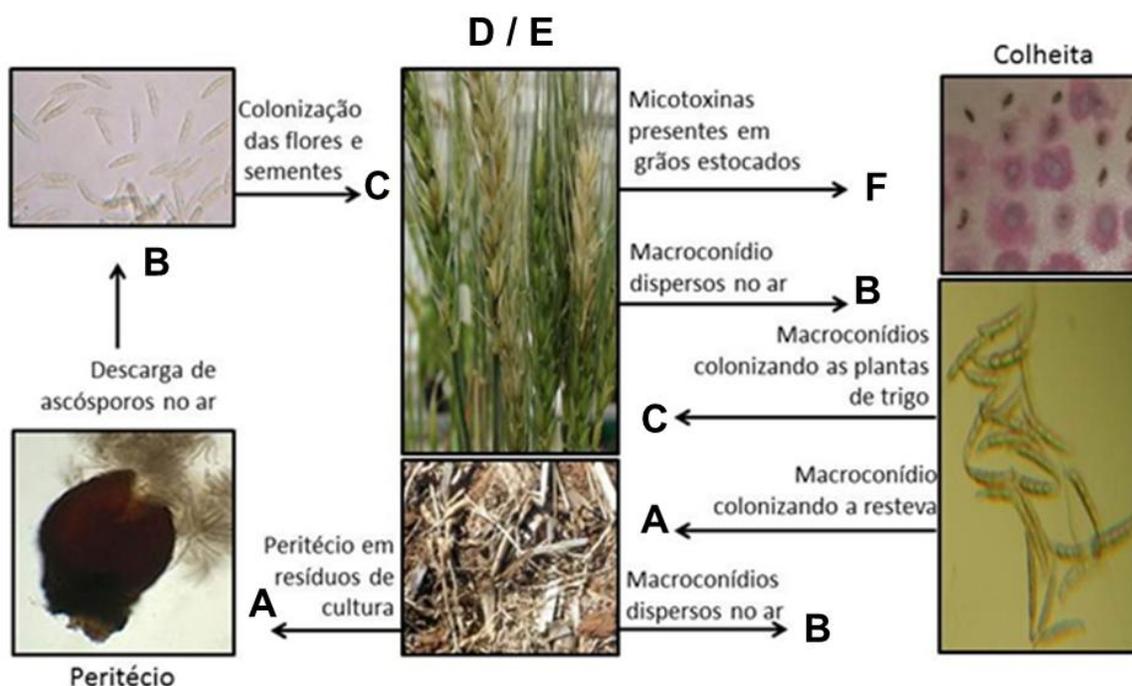
*asiaticum*, amplamente distribuído na Ásia, exibe baixo índice de autofecundação (Lee et al., 2012).

A reprodução assexuada é um modo de reprodução que não envolve a fusão de gametas e alteração do número de cromossomos. Os macroconídios (esporo assexuado) são provenientes de hifas haplóides (1n) que passam por mitose gerando um novo organismo idêntico (Leslie & Summerell, 2006; Fischer & Kues 2006; Jung et al., 2014) .

RNAs correspondentes a 5813 genes foram detectados em esporos não germinados, e 5146, 5249 e 5993, em esporos incubados em meio de germinação após 2, 8 ou 24h respectivamente. Assim, poucos genes são especificamente necessários para conidiogênese, mas a maioria dos genes relacionados são importantes bases para a fisiologia do *F. graminearum* (Seong et al., 2008). A deleção do gene *wetA*, requerido para a conidiogênese e maturação conidial, não alterou o desenvolvimento micelial e sexual em mutantes de *F. graminearum*, mas produziu alterações fenotípicas, resultando em conídios longos com poucos septos, sensíveis aos estresse oxidativo e ao calor com reduzido índice de sobrevivência. (Son et al., 2014). Os fatores transcricionais FgStuAp e Htf1 também indicaram ser necessários na formação de coniosporos e fiálides, influenciando no desenvolvimento conidial e patogenicidade de *F. graminearum* (Lysoe et al., 2011; Zheng et al., 2012).

## 2.6 Ciclo das relações patógeno/hospedeiro.

O ciclo de vida de um fungo é constituído por fases sucessivas que constituem a sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno (Parry, 1995). Etapas que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento, entre o aparecimento e reaparecimento dos esporos (Agrios, 2005) (Figura 2).



**FIGURA 2.** Monociclo de *Fusarium graminearum* em trigo: A) Sobrevivência: Garante a viabilidade do fungo em situações adversas; B) Disseminação: Propágulos que partem da fonte de inóculo e atingem o tecido suscetível sadio (liberação, dispersão e deposição); C) Infecção: Os ascosporos/macroconídios depositam-se sobre as anteras, germinam, e pelo filete atingem o ovário; D) Colonização: Fase parasitária do patógeno, invasão e exploração nutricional do hospedeiro; E) Reprodução: Produção do inóculo

sobre as glumas do hospedeiro (macroconídios), mais tarde peritécios em tecidos senescidos; F) Colheita: armazenagem de sementes infectadas, micotoxinas.

A fusariose da espiga de trigo é uma doença com ocorrência em um único ciclo completo, durante a mesma estação de cultivo, sendo considerada uma doença monocíclica, a qual apresenta fases saprofítica e biotrófica (Sutton, 1982; Del Ponte et al., 2004; Trail, 2009).

A fase saprofítica é caracterizada pela formação de macroconídios e peritécios com ascósporos inclusos em ascas, presentes em restos culturais no campo, ou em culturas não hospedeiras dispostas sobre o solo (Brown et al., 2010).

A dispersão do fungo e o início da doença são especialmente dependentes das condições climáticas favoráveis, responsáveis pela dispersão dos macroconídios pelo vento ou chuva a longas distâncias para colonização das plantas (Gilbert & Fernando, 2004).

Condições ótimas de umidade e temperatura também são exigidas para que os peritécios sejam formados. Os ascósporos são fortemente liberados do interior das ascas por mecanismos de extrusão, de forma que consigam atingir a altura das espigas das plantas (Trail et al., 2005; Hallen & Trail, 2008).

A fase em que o hospedeiro se encontra, também implica no estabelecimento da doença, especialmente durante a antese, fase inicial da suscetibilidade e formação do grão (Bushnell et al., 2003).

A fase biotrófica ocorre no início da infecção da doença com a germinação dos macroconídios. O *Fusarium graminearum* não forma estruturas

específicas para penetração da superfície da planta, não penetrando diretamente através da epiderme (Jansen et al., 2005). Utiliza as hifas para ganhar acesso através dos estômatos e outros locais dentro da inflorescência que são suscetíveis à penetração (Pritsch et al., 2000), se estabelecendo de forma intercelular e assintomática pelo xilema e medula, (Guenther & Trail, 2005).

Em continuidade, a infecção do fungo se espalha radialmente crescendo no meio intracelular, colonizando e necrosando o tecido rapidamente (Bushnell et al., 2003; Guenther & Trail, 2005).

Durante a infecção, na fase de antese, o fungo expressa genes para a biossíntese de DON quase imediatamente (Jansen et al., 2005). DON é um factor de virulência em trigo, e provoca a necrose dos tecidos (Desjardins et al.,1996) permitindo que o fungo se propague pela espigas e espiguetas do trigo (Jansen et al., 2005).

A colonização ocorre durante o desenvolvimento das sementes que é acompanhada pela acumulação DON, resultando em grão enrugado, choco e subdesenvolvido (Desjardins et al.,1996). Grãos infectados podem ser usados como semente para uma cultura de trigo subsequente, e se não tratada, pode dar origem a mudas deterioradas (Telles et al.,2007).

O fungo *Fusarium graminearum* pode completar seu ciclo de vida na cultura ou em associação com seu hospedeiro garantindo a sobrevivência e dispersão incluindo a exploração de novos nichos ou tecidos de plantas suscetíveis (Del Ponte, 2004).

## 2.7 Fungicidas agrícolas - Triazóis

Atualmente o agronegócio, vem ocupando uma posição importante na economia mundial, demonstrando grande capacidade de adaptação ao mercado, superando crises econômicas e exibindo safras recordes nos últimos anos (CONAB, 2015). Neste sentido, a crescente demanda por alimentos tornou imprescindível a busca de inúmeras tecnologias com a finalidade de combater alguns fatores limitantes à produção agrícola, como os fungos fitopatogênicos (Brent & Hollomon, 2006).

As doenças das plantas, fator limitante da produção agrícola, são responsáveis pela redução de cerca de 20% das principais culturas alimentícias do mundo (Oerk, 2006). Para atenuação das inúmeras perdas, diversas práticas agrícolas são adotadas, no entanto, quando se referem ao controle de fungos fitopatogênicos, ainda existe dependência dos fungicidas para o controle efetivo de alguns fungos (White et al., 2010).

As formulações fungicidas são constituídas por cerca de 135 princípios ativos (Brent, 1995), compostos responsáveis pela atividade biológica desejada, sendo que o mesmo princípio ativo pode ser vendido sob diferentes formulações e diversos nomes comerciais, também podendo ser encontrado produtos com mais de um princípio ativo (EPA, 2000).

O termo fungicida, nomenclatura comumente utilizada no âmbito agrônomo, sugere que a substância química utilizada elimine todos os fungos ou em sua maioria, sem maior seletividade. Entretanto, não há disponível atualmente,

um fungicida somente, que controle todos os fungos indistintamente de suas posições taxonômicas (Zambolim et al., 2008). Assim, uma substância química para ser considerada fungicida, no termo agrônomo de sua aplicação, não necessita obrigatoriamente suprimir o fungo, podendo ser fungistática ou antiesporulante, controlando apenas a doença, o crescimento micelial ou a germinação (Azevedo, 2003).

O desenvolvimento de fungicidas sistêmicos foi considerado um marco na proteção química das plantas, pois os fungos que colonizavam o xilema tornaram-se controláveis, uma vez que absorção pela planta era posteriormente distribuídos pelo sistema vascular protegendo também os tecidos recém formados (Delp, 1987).

Os triazóis (tabela 1.), são considerados um dos grupos mais importantes de fungicidas sítio-específicos sendo utilizados intensivamente desde a década de 80 contra um amplo espectro de fungos fitopatogênicos. Atuam de forma protetora ou curativa, e apresentam elevada fungitoxicidade, rápida penetração e translocação nos tecidos vegetais (Zambolim et al., 2007).

Pertencentes ao grupo dos inibidores da desmetilação do C14, inibem o citocromo P450 esterol-14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51), uma enzima essencial para a biossíntese do ergosterol que altera a integridade da membrana dos fungos, podendo controlar o patógeno em fases mais avançadas do seu ciclo (Brunton et al., 2012).

**TABELA 1.** Classificação química dos principais triazóis e mecanismo de ação envolvidos na interrupção dos processos vitais dos fungos, adaptado (FRAC, 2007).

Classe	Grupo Químico	Fungicidas	Fórmula química estrutural	Fórmula molecular
IBE's (Inibição biossintese esteróis)	Triazóis	Bromuconazol		$C_{13}H_{12}BrCl_2N_3O$
		Fluquinconazol		$C_{16}H_8Cl_2FN_5O$
		Epoxiconazol		$C_{17}H_{13}ClFN_3O$
		Tebuconazol		$C_{16}H_{22}ClN_3O$
		Difenoconazol		$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$
		Tetraconazol		$C_{13}H_{11}Cl_2F_4N_3O$
		Flutriafol		$C_{16}H_{13}F_2N_3O$
		Hexaconazol		$C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$
		Ipconazol		$C_{18}H_{24}ClN_3O$
		Metconazol		$C_{17}H_{22}ClN_3O$
		Protioconazol		$C_{14}H_{15}Cl_2N_3OS$

Estes fungicidas representaram um avanço na produtividade de várias culturas, entre elas, a do milho, na qual os fungicidas tebuconazol, flutriafol e tetraconazol apresentaram demasiada eficiência no controle de diversas doenças (Duarte et al., 2009).

Os triazóis também foram utilizados em grande escala na triticultura, e associados a avanços obtidos no Brasil nas últimas décadas. Os mais utilizados inicialmente foram o propiconazol e, posteriormente, do tebuconazol, principalmente para o controle de doenças de cereais como a fusariose da espiga do trigo (Picinini et al., 1996).

Porém, a aplicação nas safras de quantidades cada vez maiores de fungicidas para que se tenham melhores resultados, resultam em um ciclo vicioso, e um desequilíbrio ecológico, na qual simultaneamente a população de organismos resistentes aumenta (Yuen & Schoneweis, 2007). Além disso, problemas toxicológicos em humanos e animais, bem como, a deterioração da qualidade ambiental estão associados ao uso indiscriminado destas substâncias (Carvalho, 2003). Apesar das precauções com o uso dos agrotóxicos, de uma forma geral, até 70% dos produtos pulverizados nas lavouras podem ser perdidos por má aplicação, escoamento e deriva descontrolada, resultando em prejuízos econômicos e doença (ANDEF, 2010).

A utilização de alternativas que amenizem a sobrecarga de fungicidas e antifúngicos pode ser uma prática fundamental para a redução da resistência, diminuição de custos e principalmente a proteção do meio ambiente, da saúde humana e animal (Fernández-Acero et al., 2011).

### **2.7.1 *Fusarium graminearum* e a resistência**

A maioria das cultivares utilizadas no mundo são suscetíveis ao complexo *F. graminearum*, portanto, o uso de medidas de controle mais eficazes são necessárias para reduzir o impacto da fusariose da espiga de trigo (Yin et al., 2009). A aplicação do fungicida na antese, no primeiro estágio de floração torna-se essencial neste manejo (Hollingsworth et al, 2008 ).

Na China, os fungicidas benzimidazóis, em especial o carbendazim, foram extensivamente utilizados no controle da doença, desde o início dos anos 1970. Devido a grande quantidade deste fungicida aplicada em campo a resistência do complexo *F. graminearum* tem sido detectado desde 1992 (Chen et al., 2007b; Wang & Zhou, 2002). Como alternativas de controle passou-se a utilizar os fungicidas inibidores de desmetilação (DMIs), os triazóis, inibidores da Citocromo P450 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP 51), uma enzima essencial para a biossíntese do ergosterol em fungos, (Brent, 1995).

Atualmente, os triazóis, são os principais fungicidas utilizados no controle da fusariose da espiga do trigo nos principais países produtores de trigo (Paul et al., 2008; Becher et al., 2011). Os fungicidas tebuconazol, metconazol e prothioconazol estão entre os derivados azólicos com maior eficácia em suprimir os sintomas bem como a redução dos níveis de micotoxinas nos grãos maduros (Paul et al., 2008).

No entanto, falhas no controle da doença têm sido associadas com a diminuição da sensibilidade de outros agentes patogênicos importantes, tais como *Monilinia fructicola* (Chen et al., 2012), *Venturia inaequalis* (Pfeufer & Ngugi,

2012) e *Mycosphaerella graminicola* (Leroux et al., 2007) devido ao uso indiscriminado de triazóis.

Estudos mostram que o decréscimo na sensibilidade aos triazóis está relacionada a diferentes mecanismos de resistência fúngica, como as mutações no sítio alvo do gene (*CYP51*), que resultam em uma menor afinidade da proteína para os inibidores (Becker & Wirsel, 2012); na super expressão do gene *CYP51*, mais frequentemente relacionadas a inserções ou duplicações na região promotora do gene (Cools, 2012). No aumento do efluxo do fungicida pelos transportadores ABC, causados pela superexpressão de genes codificadores de transporte na membrana, envolvidos na resistência a múltiplas drogas (MDR) (Gulshan & Moye-Rowley, 2007).

No caso de *F. graminearum*, isolados DMI-resistentes têm sido detectados, mas pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares da DMI resistência envolvida nesta espécie (Yin et al., 2009).

No Brasil, devido à problemática da resistência fúngica, o monitoramento da eficácia dos fungicidas triazólicos, propiconazol, prothioconazol, tebuconazol e metaconazole utilizados nas culturas do arroz, trigo e milho, se fez necessária, para o entendimento e manejo do controle efetivo do complexo *F. graminearum* (Paul et al., 2008).

Estudos de sensibilidade de isolados de *F. graminearum* que possui um genótipo 15ADON indicaram que ele é menos sensível aos triazóis metconazol e tebuconazol que outras espécies do complexo que possuem o genótipo NIV (Spolti et al., 2012a).

Na Europa e na Ásia, o uso de triazóis no manejo da fusariose da espiga do trigo foi suspenso devido a seleção de cepas menos sensíveis de *F. graminearum* (Klix et al., 2007; Yin et al., 2009; Becher et al., 2010). O estudo de Klix et al., (2007), indicou uma redução maior na sensibilidade ao longo do tempo (1987 a 2004) de tebuconazol, seguido de metconazol e prothioconazol baseada na taxa de germinação de *F. graminearum*. Valores de baixa sensibilidade a tebuconazol também foram encontrados na China (Yin et al., 2009).

A resistência cruzada detectada em estudos sugerem semelhanças no modo de ação entre tebuconazol e metconazol (Karaoglanidis & Thanassoulopoulos, 2003, Spolti et al., 2012b) e podem ter implicações para o controle químico, e em estratégia de gestão para evitar ou minimizar o risco de resistência a fungicidas na população (Becher et al., 2011).

A preocupação ainda é mais significativa, em função da ocorrência em todo o mundo nas últimas décadas de inúmeros casos de resistência aos fungicidas DMI's, inclusive relacionados às espécies de *Fusarium*. Resultado de uma maior pressão de seleção, e o uso ineficiente aos fungicidas agrônômicos (Deising et al., 2002).

Uma lista ampla de triazóis e demais fungicidas, organizados por grupo químico é mantida pelo FRAC - Fungicide Resistance Action Committee – (FRAC, 2007), e classificados quimicamente de acordo com o esquema de classificação do FRAC/EPA (Tabela 2). As informações químicas dos fungicidas estão em PAN Pesticide Database.

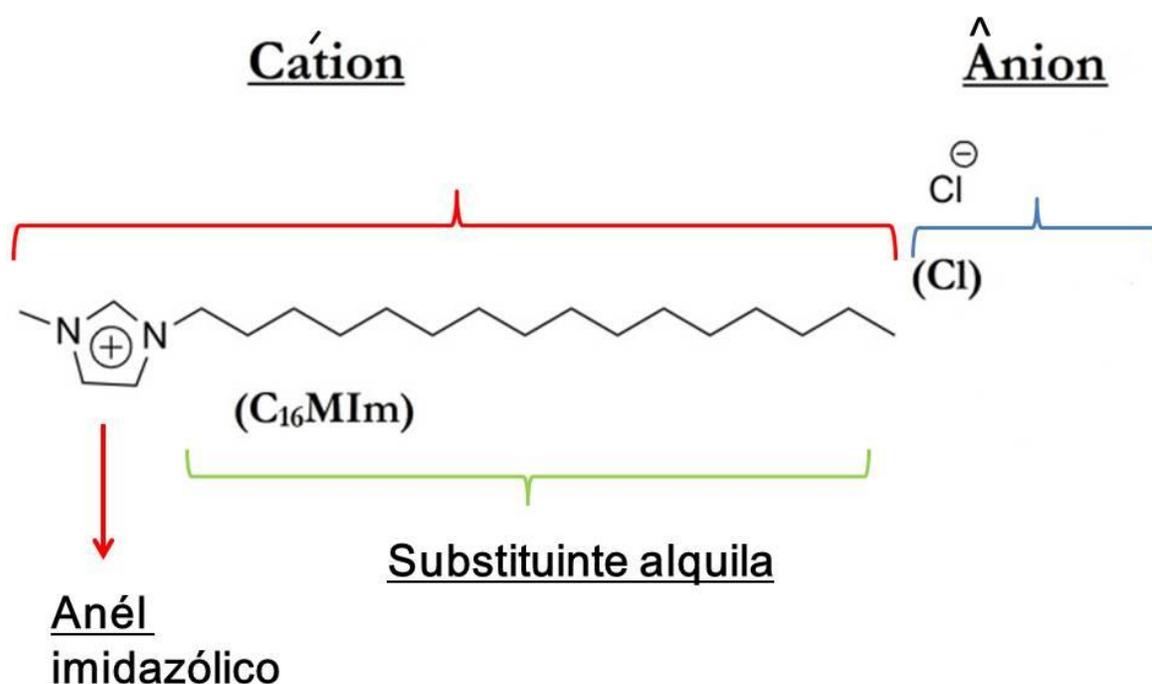
**TABELA 2.** DMI´s fungicidas e a resistência de fungos fitopatogênicos.

Modode ação	Grupos de Fungicidas	Fungos fitopatogênicos resistentes
Biossíntese de membrana –esterol	DMI Fungicidas (Inibidores da demetilação do C14) Inibição da biossíntese de ergosterol (erg11 / cyp 51)	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Blumeriella jaapii</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cercospora beticola</i> , <i>Cladosporium caryigenum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Erysiphe</i> spp., <b><i>Fusarium</i> spp.</b> , <i>Mycovellosiella natrassii</i> , <i>Nectria haematococca</i> var. <i>cucurbitae</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Pseudocercospora</i> sp., <i>Puccinia horiana</i> , <i>Septoria tritici</i> , <i>Sphaerotheca</i> spp., <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Uncinula necator</i> , <i>Ustilago</i> spp., <i>Venturia</i> spp.

Fonte: Fungicide Resistance Action Committee - List of Resistant Plant Pathogenic Organisms - January 2012 (FRAC, 2007)

## 2.8 Alternativa de controle Sais imidazólicos (SI)

Os sais imidazólicos, são compostos iônicos que representam uma classe de substâncias constituídas por um cátion orgânico, portando um anél imidazólico metilado e um ânion orgânico ou inorgânico (Riduan & Zhang, 2013) (Figura 3).



**FIGURA 3.** Estrutura química do sal imidazólico cloreto de 1-Dodecil-3-metilimidazolio.

Em geral os SI incluem um grande número de estruturas moleculares constituídas por diferentes tipos de cátions e ânions (halogênios - Br, Cl,

bis(trifluorometil) sulfonilamida, tetrafluorborato, hexafluorfosfato, dicianamida) (Plechkova & Seddon, 2008).

A composição físico-química dos SI pode ser ajustada através da modificação estrutural dos íons, incluindo as substituições dos cátions (Frade & Afonso, 2010).

Os SI que possuem propriedades importantes como pressão de vapor não considerável, alta estabilidade térmica e química, habilidade de solvatação, facilidade de purificação, ampla janela eletroquímica, alta condutividade iônica e recicláveis, inflamabilidade negligenciável e pressão de vapor (Lee, 2006; Plechkova & Seddon, 2008; Pham et al., 2010).

Na grande classe dos SI estão incluídos uma subclasse de sais fundidos, conceitualmente chamados de líquidos iônicos (LI), ou seja, sais que apresentam temperatura de fusão, próximas a 100 °C, (Deetlefs et al., 2006).

Vários materiais orgânicos que são agora classificados como SI foram descritos já em meados do século 19, (Walden, 1914). O crescente interesse decorre da sua utilidade generalizada, aplicações diversificadas, versatilidade, facilidade de sua variação estrutural, em que propriedades como anfifilicidade, lipofilicidade e solubilidade podem ser ajustadas (Anderson & Long, 2010).

A busca por novos e diferentes SI levou ao desenvolvimento progressivo e aplicação de três gerações progressivas destas moléculas. Sendo o foco inicial das pesquisas, as propriedades físicas e químicas, consideradas intrínsecas e únicas, destacando-se a densidade, viscosidade, condutividade, solubilidade, e uma elevada estabilidade térmica e química (Deetlefs et al., 2006).

Na segunda geração foi desenvolvido o potencial de sintonizar algumas dessas propriedades físicas e químicas, permitindo a formação de SI específicos para determinada aplicação, como lubrificantes, materiais energéticos, e solventes (Smiglak et al., 2007). Estas propriedades os colocam como uma classe de solventes alternativos muito explorados, principalmente em reações orgânicas (Welton, 1999), cromatografia gasosa, solvente em catálise bifásica, solvente para extração líquido-líquido, aditivos em produção de plástico, combustíveis, lubrificantes, entre outros (Zhu et al., 2011). Devido à utilização dos SI como meio racional e apresentar inúmeras características ecologicamente desejáveis, foram denominados de solventes “verdes” (Consorti et al., 2001).

A terceira e a mais recente geração envolvem ingredientes farmacêuticos ativos (active pharmaceutical ingredients (API)). Vários compostos desta classe apresentam atividade biológica relevante (Ferraz et al., 2011).

### **2.8.1 Bioaplicações**

A Bioaplicação é uma importante e emergente área onde os SI estão sendo utilizados, obtendo espaço na bioengenharia e biomecânica (Armand, et al., 2009).

As propriedades biológicas estão sendo estudadas incluindo atividades anti-inflamatorias (Gao et al. 2013), antiarrítmicas (Lis et al. 1987), antifibroticas (Zhang et al., 2009), antitumorais (Malhotra & Kumar 2010; Gao et al., 2013) e antioxidantes (Zhang et al., 2009; Zhao et al., 2008). Estudos recentes relataram s

a atividade antimicrobiana dos SI (Huang et al., 2011; Liu et al., 2012; Elshaarawy & Janiak, 2014).

Os principais agentes antimicrobianos de SI possuem ânions  $\text{MeS}^-$ ,  $\text{NTF}_2^-$  e  $\text{Cl}^-$  (Franzoi et al., 2011) associados ao anel imidazólico de natureza hidrofílica e uma longa cadeia hidrofóbica *N*-alquilica dando-lhe a natureza anfifílica (Carson et al., 2009; Pernak et al., 2003; Xu et al., 2010).

Grande parte dos estudos de desenvolvimento dos SI estão relacionados a atividade antibacteriana (Iwai & Nakayama, 2011; Cornellas et al., 2011). Os SI foram testados com sucesso como terapia antibacteriana em bactérias patogênicas gram (+) e gram (-), incluindo as espécies *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Elshaarawy & Janiak, 2014), *Salmonella typhimurium* (Demberelnyamba et al., 2004), *Pseudomonas fluorescens*; (Docherty & Kulpa, 2005), *Gaffkya tetragena*, *Sarcina lutea*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Rhodothorula glutinis* (Andrews, 2001), *M. luteus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. hirae*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* (Pernak et al., 2003).

Apesar de conhecida a função antimicrobiana do anel imidazólico presente nos sais imidazólicos, são escassas as pesquisas utilizando-os como antifúngicos, (Stella et al., 2012). Bem como, a dificuldade na obtenção de bons resultados, como ocorreu com fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* (Elshaarawy & Janiak, 2014).

No entanto, excelentes atividades antifúngicas, *in vitro*, foram verificadas com *Candida albicans* e *Rhodothorula rubra* (Pernak et al., 2003),

*Saccharomyces cerevisiae* (Docherty & Kulpa, 2005), *Aspergillus fumigatus* e *C. albicans* (Liu et al., 2013), com os fungos emergentes *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Trichosporon asahii* (Schrekker et al., 2013), tornando o tratamento destes, com sais imidazólicos selecionados, muito promissor.

### **2.8.2 Aspectos de toxicidade**

Um ponto importante relacionado ao uso de SI, como alternativa segura a antifúngicos terapêuticos, é a verificação de sua toxicidade. A indicação de genotoxicidade em células de leucócitos humanos é um dos testes que podem ser realizados por ensaios cometa do tipo versão alcalina (Cortés-Gutiérrez et al., 2011).

Utilizando esta abordagem, um grupo de seis bioativos SI bioativos ( $C_{10}MimCl$ ,  $C_{16}MimCl$ ,  $C_{16}MimPF_6$ ,  $C_{10}MimMeS$ ,  $C_{16}MimBF_4$ ,  $C_{14}MimNTf_2$ ) foram avaliados quanto a CIM. Os resultados visualizados em gel de eletroforese indicaram que nas concentrações testadas, as células de leucócitos humanos não apresentaram nenhum dano no DNA (Schrekker et al., 2013).

Enquanto o ensaio de cometa detecta lesões reversíveis, o ensaio de Micronucleos (MN) detecta danos no DNA ou efeitos mais persistentes que não podem ser reparados (Hartmann et al., 2003).

A aplicação de ensaios cometa, MN e análises de mutagênese em 11 SI, indicaram ausência de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em

células de leucócitos humanos em concentrações de até 100 vezes maiores do que os CIMs detectados em dermatófitos (Dalla Lana et al., 2015).

Outros testes como a microscopia eletrônica podem ser utilizados, nos quais a verificação da viabilidade celular após exposição aos sais imidazólicos são comparadas em relação a testemunha submetida a apenas um controle (DMSO), mostrando os níveis de viabilidade celular (Mischell & Siingi, 1980).

A avaliação da fitotoxicidade sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas, foi realizada com os SI em combinação com os ânions, brometo, nitrato  $\text{NO}_3$ , *p*-toluenossulfonato (tosilato), dimetilfosfato e metanossulfonato. Para a análise foram considerados sinais de fitotoxicidade, o nível da massa vegetal seco e fresco, inibição do crescimento e alterações cloróticas. Os resultados indicaram impacto negativo dos SI nas plantas testadas e os efeitos tóxicos foram dependentes principalmente da concentração do ânion aplicado e da cultura utilizada (Biczak et al., 2014).

O conhecimento do comportamento dos SI no ambiente terrestre inclui a degradação microbiana, sorção e dessorção, o que é igualmente importante, uma vez que ambos o solo e meio aquático são possíveis destinatários de contaminação (Pham et al., 2010).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Testes *in vitro***

##### **3.1.1 Amostras utilizadas para o estudo**

###### **3.1.1.1 Isolados do CEFG**

Para esta pesquisa foram utilizadas 13 isolados do CEFG (Tabela 3) que foram fornecidos pelo Prof. Emerson M. Del Ponte, oriundos da micoteca de fungos micotoxigênicos do Laboratório de Epidemiologia de plantas do Departamento de Fitopatologia- Faculdade de Agronomia / UFRGS.

**TABELA 3.** Informações sobre os isolados do complexo de espécies *Fusarium graminearum* utilizados neste estudo.

Código Isolados	Espécies	Hospedeiro de origem	Experimento <sup>1</sup>	Referências <sup>2</sup>
09Tr110	<i>F. graminearum</i>	Trigo	CIM	Del Ponte <i>et al.</i> , (2015)
09Tr130	<i>F. graminearum</i>	Trigo	CIM, CE <sub>50</sub> ; TKA	Del Ponte <i>et al.</i> , (2015)
09Tr26	<i>F. graminearum</i>	Trigo	CIM	Del Ponte <i>et al.</i> , (2015)
09Tr107	<i>F. graminearum</i>	Trigo	CIM	Del Ponte <i>et al.</i> , (2015)
08Tr044	<i>F. graminearum</i>	Trigo	TP	Spolti and Del Ponte (2013)
09Mi15	<i>F. meridionale</i>	Milho	CIM	(não publicado)
09Mi21	<i>F. meridionale</i>	Milho	CIM	(não publicado)
011Mi18	<i>F. meridionale</i>	Milho	CIM	(não publicado)
011Mi25	<i>F. meridionale</i>	Milho	CIM CE <sub>50</sub> , TKA	(não publicado)
09Ar21	<i>F. asiaticum</i>	Arroz	CIM	Gomes <i>et al.</i> , (2015)
09Ar24	<i>F. asiaticum</i>	Arroz	CIM	Gomes <i>et al.</i> , (2015)
09Ar26	<i>F. asiaticum</i>	Arroz	CIM	Gomes <i>et al.</i> , (2015)
09Ar04	<i>F. asiaticum</i>	Arroz	CIM, CE <sub>50</sub> , TKA	Gomes <i>et al.</i> , (2015)

<sup>1</sup> CIM: Concentração mínima inibitória; CE<sub>50</sub>: Concentração que resulta em 50% da inibição do crescimento micelial; TKA: tempo de morte; TP: teste em planta

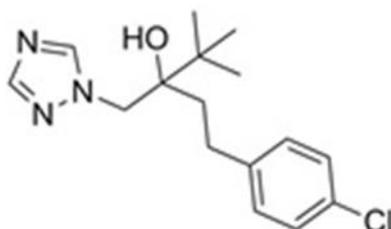
### 3.1.1.2 Cultivar de trigo

O potencial produtivo, tanto quanto a reação às doenças são características genéticas peculiares de cada cultivar, sendo assim, foi verificada a resposta dos cultivares de trigo Guamirin, (EMBRAPA TRIGO) frente aos SI e tecubonazol nos testes *in vivo*.

### 3.1.1.3 Fungicida Agrícola

Foi testado nesta pesquisa o fungicida usual indicado para o controle do *Fusarium graminearum*: o tebuconazol (Nortox 200 EC, Nortox S.A), apresentando peso molecular de 307,92 g/mol<sup>-1</sup> (Figura 4.)

### Tebuconazole

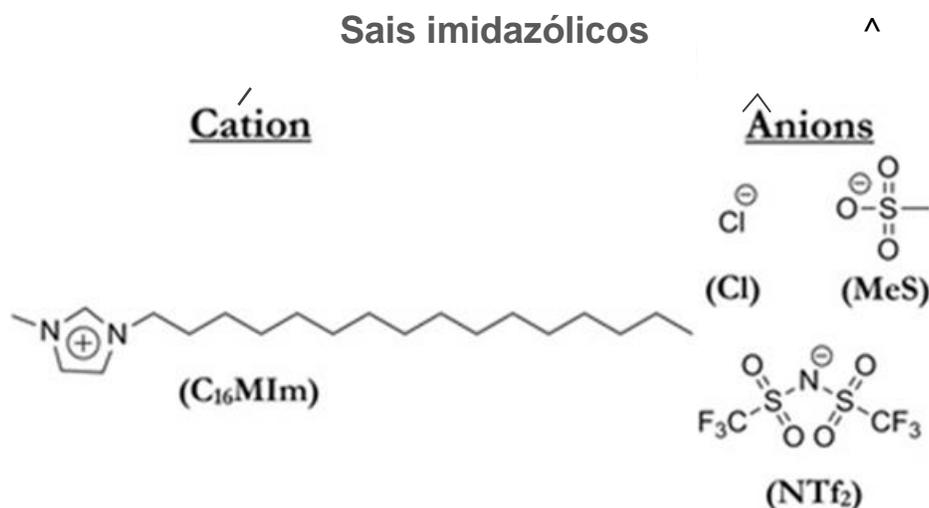


**FIGURA 4 .** Estrutura do fungicida tebuconazol utilizado neste trabalho

#### 3.1.1.4 Sais imidazólicos

Foram selecionados três SI, com estruturas variáveis, conforme Figura 5., que foram sintetizados (pureza final  $\geq 98\%$ ) como descrito por (Cassol et al., 2006; Schrekker et al., 2008) (Tabela 4).

#### Sais imidazólicos



**FIGURA 5.** Variações dos ânions constituintes dos sais imidazólicos utilizados neste estudo

**TABELA 4.** Informação química dos três sais imidazólicos testados para supressão das espécies de *Fusarium* que afetam culturas de cereais.

Código	Nome	Fórmula Química	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )
SI-Cl	Cloreto de 1-n-hexadecil-3-metilimidazolio	C <sub>16</sub> MImCl	342,99
SI-MeS	Pentanossulfonato de 1-n-hexadecil-3-metilimidazolio	C <sub>16</sub> MImMeS	402,32
SI-NTf <sub>2</sub>	bis(trifluorometilsulfonil) amideto de 1-n-hexadecil-3-metilimidazolio	C <sub>16</sub> MImNTf <sub>2</sub>	587,71

### 3.1.2 Testes de susceptibilidade *in vitro* pela concentração inibitória mínima (CIM) em microplaca de titulação.

#### 3.1.2.1 Diluição do fungicidas e dos sais imidazólicos

Para a avaliação da CIM dos fungicidas, a diluição destes seguiu as recomendações do protocolo M38-A2 do CLSI (2008). O fungicida solúvel em água foi preparado em uma solução estoque. No momento do teste esta solução foi diluída para obter uma solução de 100µg/mL<sup>-1</sup>, 2 vezes mais concentrada que a maior concentração a ser testada.

### 3.1.2.2 Preparo do inóculo de fungos filamentosos

O inóculo fúngico utilizado nos ensaios consiste de uma suspensão de conídios obtidos a partir de culturas de 5 dias de idade, cultivadas em meios SNA e ajustadas em câmara de Neubauer para a uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  conídios /mL (Spolti et al., 2012b). O inóculo do teste foi produzido em quantidade suficiente para inocular diretamente cada poço com 0,1 mL da correspondente suspensão de inóculo.

O teste de susceptibilidade, segundo o protocolo M38-A2 da CLSI (2008), foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com múltiplos poços (96 poços em formato de U). No primeiro poço de cada fileira horizontal da placa, foi colocado 200 µL do fungicida a ser avaliado, do segundo ao décimo poço 100 µl meio RPMI, no décimo primeiro poço foi colocado 200 µl de meio RPMI (controle negativo), e no décimo segundo poço coloca-se 100 µl meio RPMI e 100 µl de inóculo (preparado com descrito anteriormente) de cada isolado de fungo (controle positivo). Posteriormente foi realizada uma diluição seriada com volume de 100 µl, indo do 1º poço até o 10º poço, desprezando-se no final um volume de 100 µl da solução de diluição. Em seguida colocado 100 µL de inóculo do fungo do primeiro ao décimo poço, e incubada as placas tampadas a 25 °C por 48 horas em estufa sem agitação. Após esta etapa foi realizada a leitura macroscópica da placa.

### 3.1.2.3 Determinação da CIM

A leitura para determinação da CIM total foi procedida, a partir do método visual, observando-se o desenvolvimento do microrganismo em relação ao controle negativo, considerando-se a formação ou não de crescimento micelial na cavidade da placa e turvação do meio.

Foi determinada como CIM, a menor concentração do fungicida em teste, capaz de produzir inibição total da germinação dos esporos e do crescimento micelial dos fungos. A confirmação foi realizada pela visualização da dos esporos em microscopia óptica (10x e 40x).

Três leituras (triplica) foram feitas para cada combinação antifúngica, e toda a experiência foi repetida duas vezes. Os resultado dos valores de CIM expresso em  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  e  $\text{nmol}/\text{mL}^{-1}$ . A CIM em  $\text{nmol}/\text{mL}^{-1}$  foi obtida pela divisão do valor da CIM em  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  pela massa molar de cada composto e multiplicação desse valor resultante por 1000.

Dados de CIM foram transformados e utilizando em modelagens mistas em que espécies fúngicas e antifúngicos foram analisados. As médias dos quadrados mínimos do CIM foram estimadas e múltiplas comparações foram feitas com base no teste de Tukey a 1% de significância.

### 3.1.3 Avaliação de inibição de crescimento micelial em placa de Petri (concentração efetiva de 50%- $\text{CE}_{50}$ )

Colônias fúngicas dos isolados *Fusarium graminearum* 09TR130, *Fusarium asiaticum* 09AR004 e *Fusarium meridionale* 09MI025, oriundos da

coleção do Laboratório de Epidemiologia de plantas da Faculdade de Agronomia da UFRGS, foram cultivadas em Agar Batata dextrose (BDA) por sete dias para a retirada de discos de micélio com seis mm de diâmetros, os quais foram transferidos para o centro de novas placas de Petri com o meio BDA contendo separadamente os SI C<sub>16</sub>MImCl, C<sub>16</sub>MImMeS, C<sub>16</sub>MImNTf<sub>2</sub> nas diluições 0 µg/mL<sup>-1</sup>, 100 µg/mL<sup>-1</sup>, 200 µg/mL<sup>-1</sup>, 400 µg/mL<sup>-1</sup>, 800 µg/mL, 1.600 µg/mL<sup>-1</sup> e testemunha sem tratamento. Essas foram mantidas a 25 ± 2°C em escuro contínuo.

O diâmetro da colônia foi medido após seis dias, em duas direções perpendiculares. Foram utilizadas três repetições por isolado. O experimento foi realizado duas vezes e os dados combinados para análise. (Becher et al., 2010; Spolti et al., 2012b).

Os valores de CE<sub>50</sub> para cada anti-fúngicos foram estimadas por um modelo log-logístico para a média do crescimento radial das culturas de cada espécie. Os cálculos foram realizados no pacote drc do R (Ritz & Streibig, 2005).

### **3.1.4 Ensaio do tempo de morte (Time Kill Assay)**

Este teste analisa o tempo que o SI C<sub>16</sub>MImCl leva para eliminar os fungos fitopatogênicos do CEF, representados neste trabalho pelos mesmos isolados do teste anterior (item 3.1.3), bem como, a determinação da concentração da atividade fungicida exercida pelo SI a partir de uma curva.

Os inóculos foram preparados na concentração de 2,5 x 10<sup>5</sup> UFC / mL foram incubados na presença de concentrações correspondentes de C<sub>16</sub>MImCl para CIM (3,12 µg/mL<sup>-1</sup>), 2XCIM (6,25 µg/mL<sup>-1</sup>) e 4XCIM (12,48 µg/mL<sup>-1</sup>), também

foi incluído no teste um controle não tratado para comparação de efeito. Em 1, 6, 12, 24, e 48 h, 0,1 mL de volume de suspensão de conídios foi removida e diluída para se obter  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  diluições, posteriormente 0,1 mL, 0,01 mL e 0,001 mL de alíquota foi espalhada em placas de BDA em triplicata e incubados a 25 °C durante 48 h. Os experimentos foram realizados em triplicata das quais uma média foi calculada.

Para análise do tempo de morte, curvas foram construídas através da representação gráfica da média  $\pm$  desvio padrão (DP) da contagem de colônias ( $\log_{10}$  UFC/mL) em função do tempo (horas) (Natesan et al., 2008; Lewis et al., 2002).

### **3.2 Testes *in vivo***

#### **3.2.1 Análise qualitativa da incidência e severidade em plantas de trigo**

Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação e na câmara de crescimento com ambiente controlado na Faculdade de agronomia da UFRGS. Sementes da cultivar de trigo BRS Guamirim, foram semeadas em vasos 5L (10 sementes / vaso) contendo substrato 1: 1: 1 (húmus, solo e vermiculita) com fertilizante NPK (10:10:10) e mantidos em casa de vegetação desde o plantio à maturação fisiológica dos grãos.

A temperatura média na estufa durante o experimento foi de 26 °C e umidade relativa  $\geq 60\%$ . As práticas culturais foram realizadas de acordo com a recomendação oficial (Reunião, 2002).

Para o experimento foi utilizado um único isolado virulento e produtor de micotoxina, *F. graminearum* 08TR044TGRA -15ADON, determinado previamente em pesquisa de inoculação em plantas como agressivo para o trigo (Spolti & Del Ponte, 2013).

O inóculo foi produzido tal como anteriormente descrito e a sua concentração foi ajustada para  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada repetição consistindo de um vaso de 5 L com 7 a 10 sementes.

O experimento foi um fatorial  $2 \times 2 \times 2$  com dois antifúngico (SI-CL e tebuconazol), duas doses (0,5 g/L) e duas épocas de aplicação (preventivo e curativo). Um tratamento negativo com plantas inoculadas e não tratadas e um tratamento positivo somente com plantas tratadas. A inoculação das plantas foi realizada cerca de uma semana após o início da antese, as plantas foram pulverizadas (1 mL) diretamente nas espigas de trigo com uma suspensão de esporos ( $2,5 \times 10^5$  conídios/mL). Todos as hastes de um único vaso foram cobertas com um saco plástico e enviadas para uma câmara de crescimento com temperatura constante de 25 °C durante 48 horas para promover a umidade para a infecção (Spolti & Del ponte, 2013).

Os tratamentos com fungicida e SI foram aplicados por meio de pulverização da solução sobre as hastes no volume de 1 mL por espiga. Para a aplicação preventiva, o spray-inoculação foi realizado uma hora após a aplicação do tratamento antifúngico, seguido por incubação 48 h em condições úmidas. Para a aplicação curativa, as plantas inoculadas foram pulverizadas com os

antifúngicos 48 h após a incubação para permitir que o fungo infecte a planta. Após 48 h, as plantas foram transferidas de volta a estufa e monitoradas diariamente. Para ambas as inoculações, as variáveis medidas foram: incidência (percentual de espigas apresentando sintomas) e severidade (percentual de espiguetas apresentando sintomas) nos 7 dias após a inoculação (Spolti et al., 2013). Estas variáveis foram avaliadas, de acordo com escala visual de severidade de Stack & McMullen (1995). Com os dados de incidência (I) e severidade (S) foi obtido o índice da fusariose da espiga de trigo (ID), pela fórmula:  $ID = (S \times I)/100$ . Teste de Levene e a Anova foi realizada com a interação dos efeitos estimados ao nível de significância de 5%. As médias dos tratamentos foram comparadas usando o pacote lsmeans de R.

### **3.2.2 Análise quantitativa da incidência de *F. graminearum* em grãos de trigo**

Na época da maturação fisiológica, cerca de 30 dias após a floração, as espigas foram trilhadas manualmente, separadas e nomeadas para condução de experimento segundo o método do papel filtro blotter test, (RAS, 2009). Caixas de acrílicas para germinação (gerbox) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2%, no interior inserido três folhas de papel filtro cortadas (10,5 x 10,5 cm), previamente esterilizadas a 160 °C por 20 minutos. O papel foi umedecido com água esterilizada. Cada tratamento contou com o total de 120 sementes tomadas aleatoriamente, distribuídos em 4 repetições de 30 sementes cada (Neves et al., 2009). A percentagem de grãos de Fusarium danificados (FDK) foi determinada

com base em um teste de Levene e Anova ao nível de significância de 5%. As médias dos tratamentos comparados usando o pacote *lsmeans* de R.

### **3.2.3 Análise de germinação e sinais de fitotoxicidade em sementes sadias expostas ao SI C<sub>16</sub>MImCl**

O experimento foi realizado por meio do método do papel filtro *blotter test*, conforme relatado anteriormente (RAS, 2009). Caixas acrílicas para germinação (gerbox) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% e no interior inserido três folhas de papel filtro cortadas (10,5 x 10,5 cm), previamente esterilizadas a 160 °C por 20 minutos. O papel foi umedecido com água esterilizada. Cada tratamento contou com o total de 100 sementes tomadas aleatoriamente, distribuídos em 4 repetições de 25 sementes cada. Todo experimento repetido três vezes. As sementes receberam dois tratamentos, um somente água (testemunha), e outro com a exposição dos grãos por 10 minutos ao SI C<sub>16</sub>MImCl na concentração de 2 g/L. A incubação foi realizada em ambiente controlado a 25°C, por 14 dias com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação contou como semente germinada, o comprimento dos coleóptilos (parte superior) (>5 mm) (Minkvold & O'Mara, 2002). (Browne & Cooke, 2005).

Comparou-se a diferença entre as médias dos grupos teste e controle, dois a dois, utilizando-se o teste do “t” de Student para amostras independentes, adotando-se o nível de significância de 5% para interpretação dos resultados. Assim, foram consideradas significativas as diferenças quando a probabilidade foi igual ou inferior a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

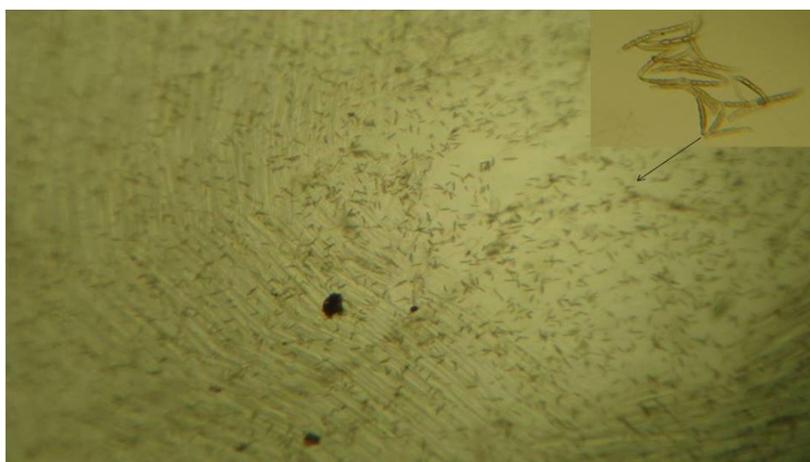


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Testes *in vitro*

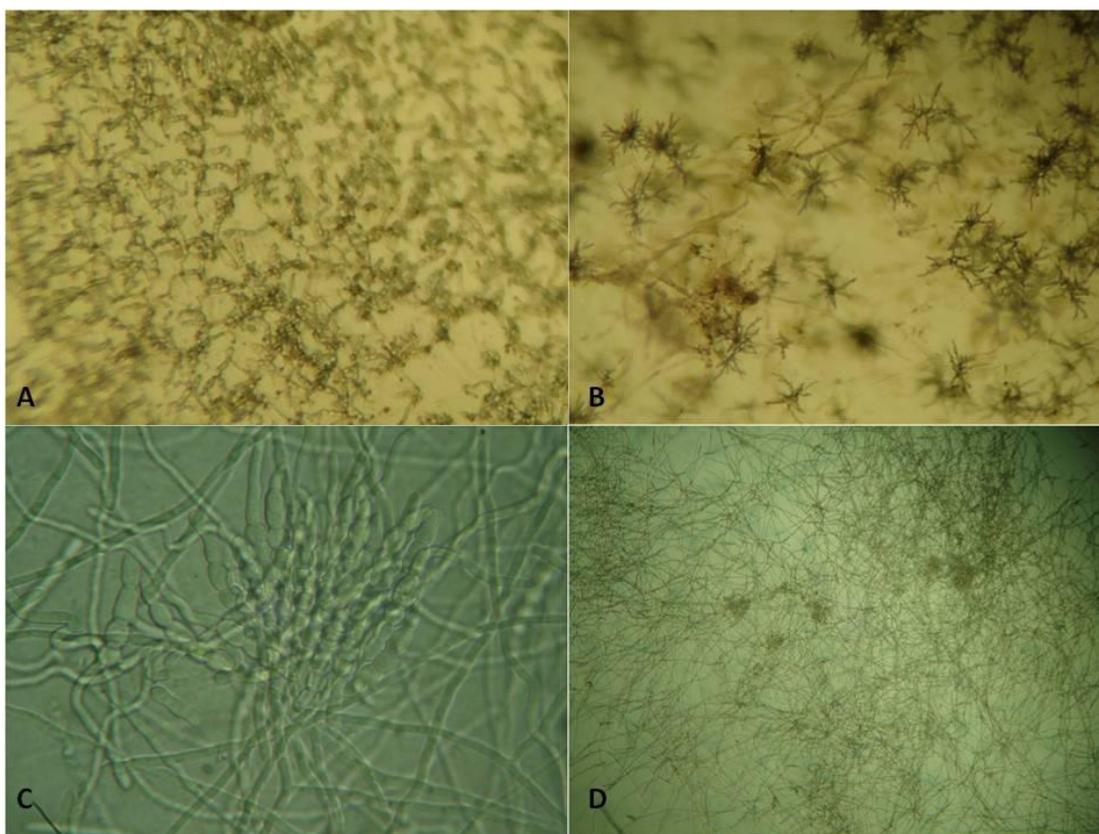
#### 4.1.1 Testes de susceptibilidade *in vitro* pela CIM em microplaca de titulação

Os testes de CIM realizados em placas de microtitulação foram averiguados em microscopia óptica (40x), de tal forma que o fundo dos poços fossem visualizados, e a ausência ou presença de esporos germinados nas diferentes concentrações testadas confirmadas (Figura 6). Constatou-se que nas concentrações de  $50 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ,  $12,48 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ,  $6,25 \mu\text{g/mL}^{-1}$  e  $3,12 \mu\text{g/mL}^{-1}$  não houve a germinação dos esporos, até o período estipulado de 48h horas.



**FIGURA 6.** Imagem dos esporos tratados com  $\text{C}_{16}\text{MImCl}$  apresentando ausência de germinação na concentração inibitória mínima de  $3,12 \mu\text{g/mL}^{-1}$ .

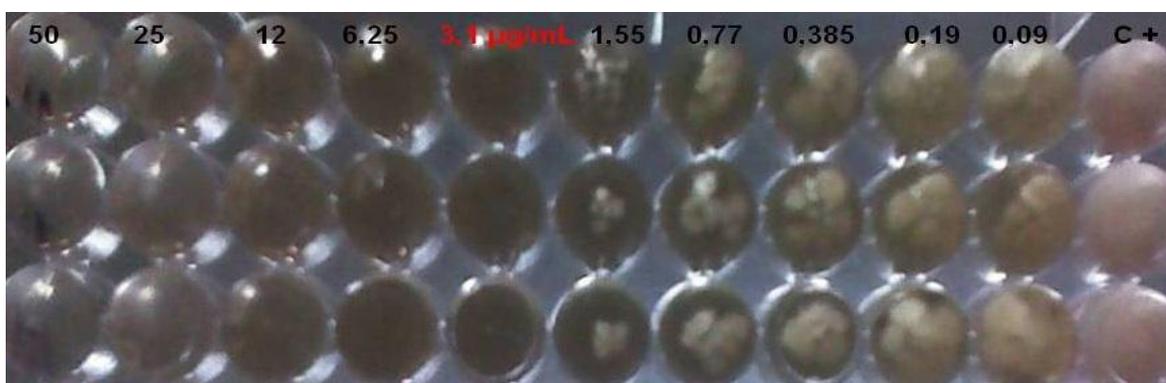
Os demais poços analisados por microscopia óptica continham o SI nas concentrações menores de  $1,55$ ,  $0,77$ ,  $0,38$   $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ,  $0,19$  e  $0,09$   $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Nestas concentrações, em geral, observou-se uma evolução na germinação, uma sequência que iniciava com os esporos germinando seguido do crescimento e adensamento micelial que aumentava até não haver mais esporos (Figura 7).



**FIGURA 7.** Visualização do processo de germinação ao crescimento micelial sob a ação do SI  $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ . (A) Emissão do tubo germinativo partindo dos esporos, (B) grande parte dos esporos em germinação com o início crescimento micelial, (C) crescimento micelial com a presença de esporos em germinação e (D) grande quantidade de micélio e poucos esporos em germinação.

O SI C<sub>16</sub>MImNTf<sub>2</sub>, não apresentou efeito inibitório nas concentrações testadas no teste de CIM para nenhuma das espécies.

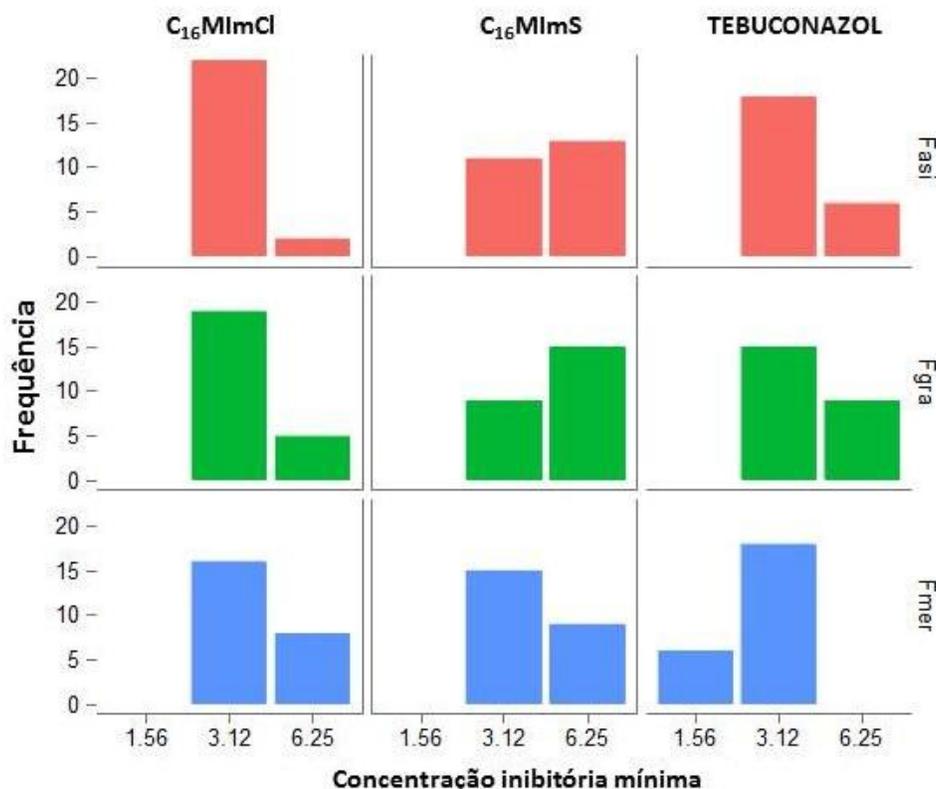
Os valores de CIM para C<sub>16</sub>MImCl foram homogêneos como indicado no gráfico de frequência, formando um único pico de 3,12 µg/mL<sup>-1</sup> (9,09 nmol/mL<sup>-1</sup>) para todos os isolados do complexo *Fusarium graminearum* (Figura 8.).



**FIGURA 8.** Concentração inibitória mínima de *Fusarium asiaticum* com o SI C<sub>16</sub>MImCl

Para o SI C<sub>16</sub>MimMeS as médias indicaram os valores de CIM's que variam de 3,12 µg/mL<sup>-1</sup> (7,75 nmol/mL<sup>-1</sup>) (*F. meridionale*) a 6,25 µg/mL<sup>-1</sup> (15,53 nmol/mL<sup>-1</sup>) (*F. graminearum* e *F. asiaticum*), mostrando uma maior frequência para este último valor (Figura 9).

Em relação ao fungicida usual tebuconazol, os CIM alcançaram ampla variação, com valores de 1,5 µg/mL<sup>-1</sup> (4,87 nmol/mL<sup>-1</sup>) (*F. meridionale*) a 6,25 µg/mL<sup>-1</sup> (20,29 nmol/mL<sup>-1</sup>) (*F. graminearum* e *F. asiaticum*), apresentando a maior frequência para o CIM 3,12 µg/mL (10,13 nmol/mL<sup>-1</sup>) para todas espécies.



**FIGURA 9.** Frequência da concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , valores que inibiram a germinação de três membros CEFG (Fasi = *F. asiaticum*; Fgra = *F. graminearum*; Fmer = *F. meridionale*).

A média e a mediana dos valores de CIM não indicaram diferença significativa entre os sais imidazólicos C<sub>16</sub>MImCl e C<sub>16</sub>MImMeS. Porém, quando avaliados os SIs com o fungicida usual tebuconazol, foi observada diferença significativa somente em relação aos valores de CIM da espécie *F. meridionale* (Tabela 5).

Quando comparadas as espécies *F. meridionale*, *F. graminearum* e *F. asiaticum*, entre si, em resposta a cada sal, não foi verificada diferenças significativas de sensibilidade para ambos C<sub>16</sub>MImCl e C<sub>16</sub>MImMeS.

No entanto, a espécie, quando tratada com o fungicida tebuconazol, mostraram diferenças de resposta na sensibilidade (Tabela 5). Estatisticamente a partir de Anova, o termo de interação foi significativo CIM (P <0,05).

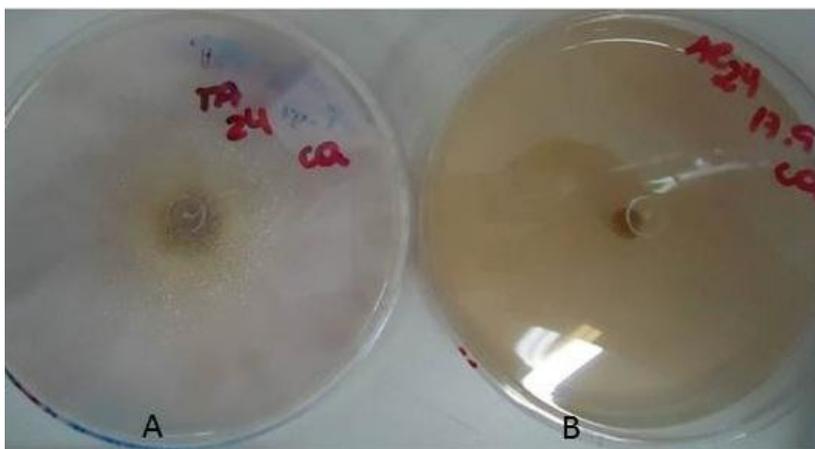
**TABELA 5.** Valores médios da concentração inibitória mínima (CIM) para dois sais imidazólicos e um fungicida químico que suprimiram o crescimento de isolados representantes de três membros do CEEG

<sup>2</sup> Sais Imidazolicos	CIM		
	<i>F. asiaticum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. meridionale</i>
SI-CI	3.12 / 3.38 <sup>Aa</sup>	3.12 / 3.77 <sup>Aa</sup>	3.12 / 4.16 <sup>Aa</sup>
SI-MeS	6.25 / 4.81 <sup>Aa</sup>	6.25 / 5.07 <sup>Aa</sup>	3.12 / 4.29 <sup>Aa</sup>
Tebuconazol	3.12 / 3.90 <sup>Aba</sup>	3.12 / 4.29 <sup>Aa</sup>	3.12 / 2.73 <sup>Bb</sup>

<sup>1</sup> Valores seguidos de mesma letra não diferem, baseados no teste de multi-comparação Tukey em que os dados de CIM foram transformados em categorias (n = 4 isolados x 3 replicatas x 2 experimentos = 24 leituras). Letras maiúsculas comparar dados em colunas e letras minúsculas comparar dados em linhas. <sup>2</sup> 1) SI-CI - (C<sub>16</sub>MImCI); 2) SI-MeS - (C<sub>16</sub>MimMeS)

#### 4.1.2 Avaliação de inibição de crescimento micelial – CE<sub>50</sub>

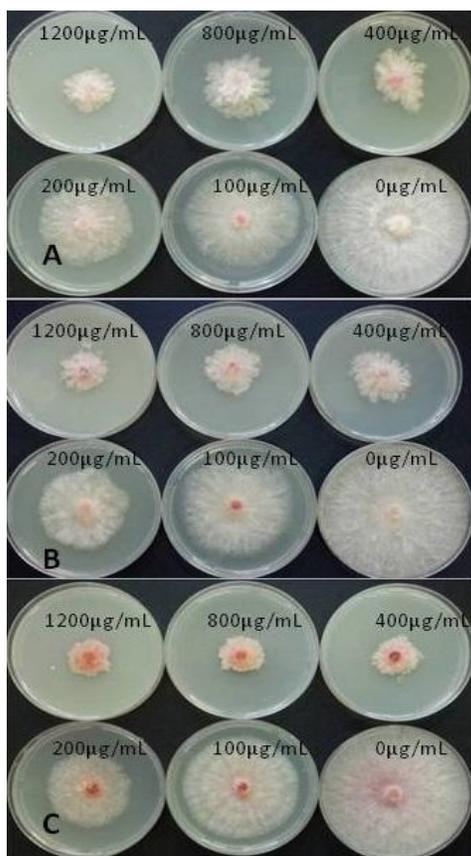
O fungicida tebuconazol foi utilizado como referência neste teste, com as mesmas doses que os SI. O efeito antifúngico de tebuconazol no crescimento micelial foi de 100% para todas as espécies (Figura 10).



**FIGURA 10.** Teste de crescimento micelial com o fungicida tebuconazol. A) testemunha sem adição de fungicida. B) Ausência do crescimento micelial na dose de 0,4 g/L.

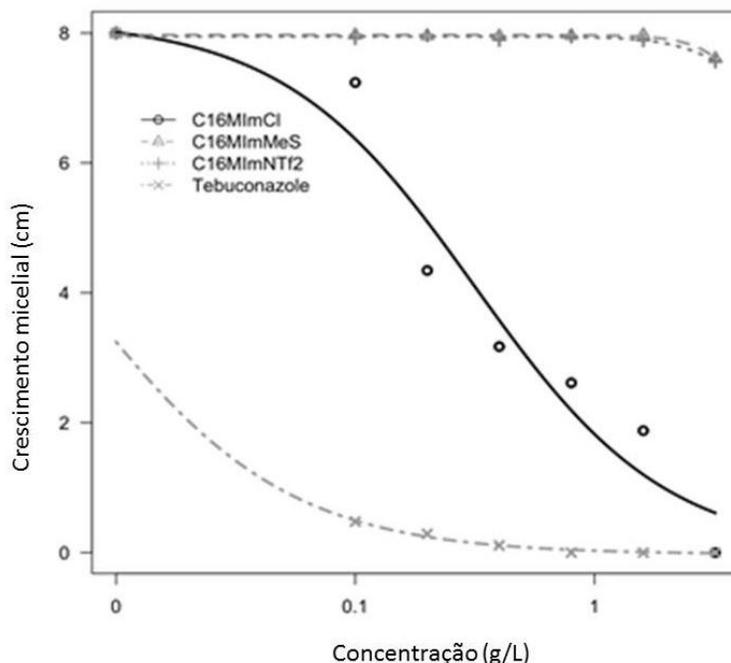
Os resultados da estimativa de  $CE_{50}$  entre os SI testados indicaram diferentes respostas de fungitoxicidade. Os resultados da ação do  $C_{16}MImCl$  em meio sólido de cultivo indicou uma significativa redução micelial em comparação com a testemunha que não recebeu o tratamento (Figura 11).

Os resultados da média dos valores da dose de  $CE_{50}$  para o  $C_{16}MImCl$  foi determinada em 0,316 g/L, não havendo diferença de resposta entre as espécies CEFG.



**FIGURA 11.** Crescimento micelial (A) *Fusarium graminearum*, (B) *F. asiaticum* e (C) *F. meridionale*.

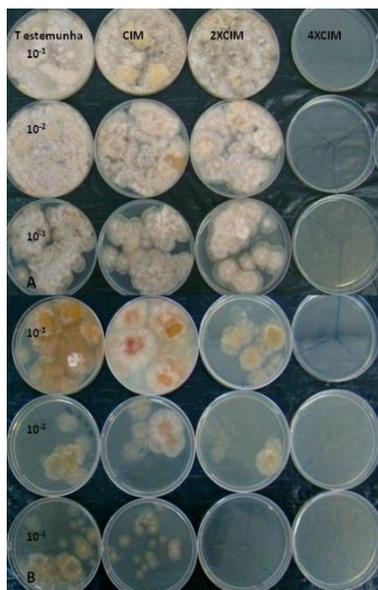
As análises de crescimento micelial com o com o SI C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>16</sub>MimNTf<sub>2</sub> foram realizadas duas vezes e pouco diferiram dos resultados das testemunhas. O efeito fungicida não foi efetivo na inibição do crescimento micelial nas concentrações testadas, apresentando valores de CE<sub>50</sub> maiores que (4 g/L), não caracterizando ação antifúngica nas concentrações testadas. Devido aos resultados negativos de CE<sub>50</sub> com estes sais os demais testes foram realizados com o sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl. Em contraste, o fungistático tebuconazol, apresentou elevada efetividade apresentando valores extremamente baixos de CE<sub>50</sub> (0,006 g/L) quando comparada com o C<sub>16</sub>MImCl (Figura. 12)



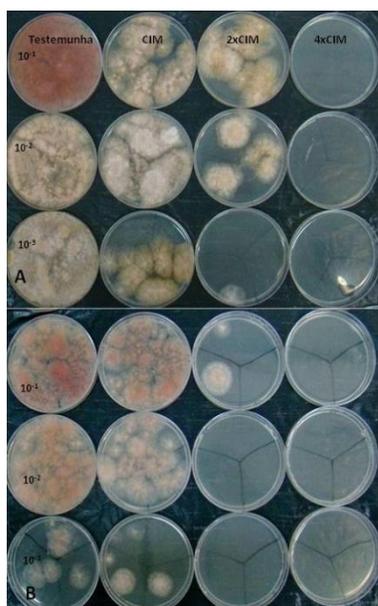
**FIGURA 12.** Média observada (símbolos) e valores ajustados (linhas) modelo log-ajustado para a resposta do crescimento micelial de três membros do complexo de espécies *Fusarium graminearum*, para doses crescentes de três SI e um fungicida comercial (tebuconazol). A estimativa de CE (dose eficaz que reduz de 50% do crescimento micelial) foi obtida somente para C<sub>16</sub>MimCl (0,316) e tebuconazol (0,006).

#### 4.1.3 Ensaio de curva de morte

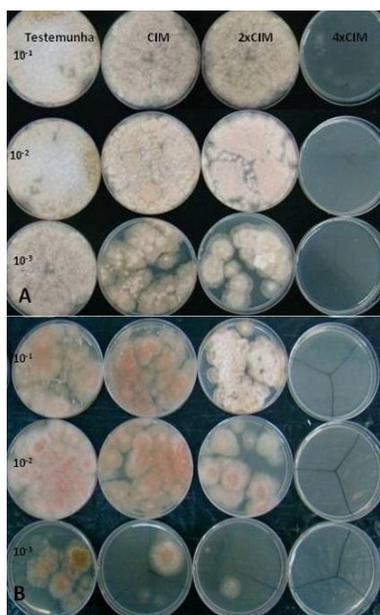
O tempo de morte é um processo dinâmico que é usado para a avaliação de novos agentes antimicrobianos, sendo possível determinar se o agente tem um efeito fungistático ou fungicida e se o processo de morte é dependente somente da concentração ou do tempo (Pfaller *et al.*,2004). Desta forma observou-se na amostra controle (sem SI), um aumento gradual no número de colônias, para as três espécies analisadas (*F. asiaticum*, *F. meridionale*, *F. graminearum*) nas 48 horas de análise (Figuras 13,14 e 15).



**FIGURA 13.** Tempo de morte de *Fusarium asiaticum* nas concentrações da testemunha (sem tratamento), CIM (3,12 µg/mL), 2XCIM (6,25 µg/mL) e 4XCIM (12,48 µg/mL), em três diluições em 24 horas (A) e 48 horas (B).



**FIGURA 14.** Tempo de morte de *Fusarium meridionale* nas concentrações da testemunha (sem tratamento), CIM (3,12 µg/mL), 2XCIM (6,25 µg/mL) e 4XCIM (12,48 µg/mL), em três diluições em 24 horas (A) e 48 horas (B)

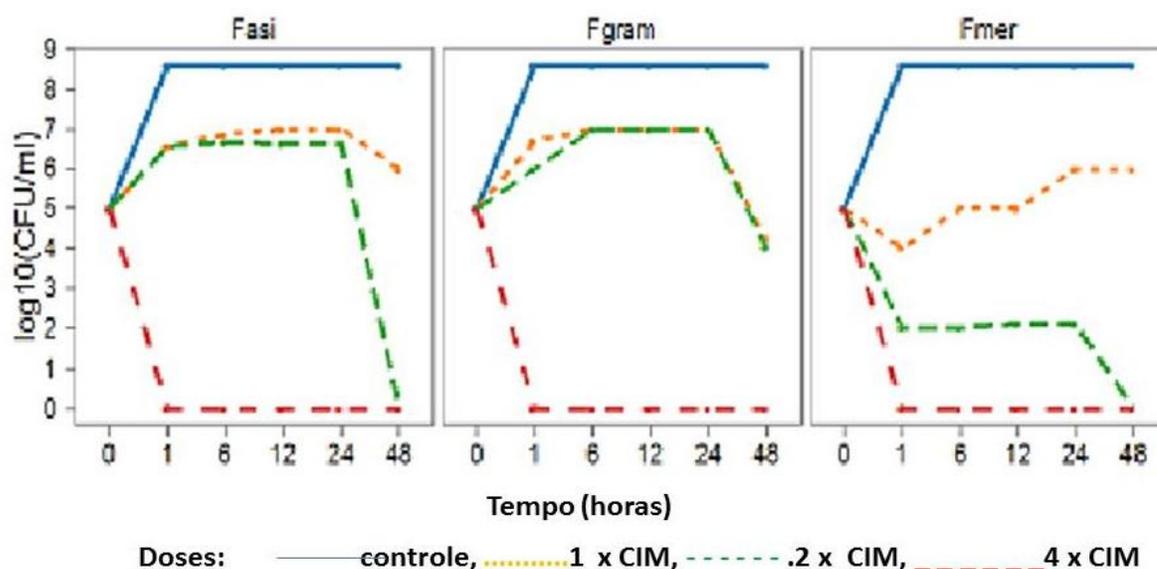


**FIGURA 15.** Tempo de morte de *Fusarium graminearum* nas concentrações da testemunha (sem tratamento), CIM (3,12 µg/mL), 2xCIM (6,25 µg/mL) e 4xCIM (12,48 µg/mL), em três diluições em 24 horas (A) e 48 horas (B).

As amostras tratadas com o sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl, na concentração correspondente ao CIM, apresentaram uma diminuição gradual no número de UFC com o decorrer do tempo, indicando concentrações subletais. Quando a concentração testada foi de 2xCIM (6,25 µg/mL) as curva de tempo de morte do *F. meridionale* e *F. asiaticum* se diferenciaram da curva de *F. graminearum* indicando ação fungicida nesta concentração, mas com ação após 48h horas de análise. Indicando que nesta concentração a ação fungicida foi dependente de um tempo maior. Porém, na concentração de 4xCIM, correspondente a 12,48 µg/mL para todas as espécies, constatou-se ausência total de (UFC), configurando a ação fungicida do composto. Nestas condições a ação foi dependente de uma dose

mais alta, mas não do tempo, pois desde a primeira hora de incubação houve ausência de crescimento micelial (Figura 16).

Concentrações fungicidas, quatro vezes maiores que o valor de CIM (12,48  $\mu\text{g/mL}$ ) parecem ser o limiar do composto avaliado para o CEFG, exibindo um efeito rápido e duradouro, durante o período de 1h à 48 h de observação da análise.



**FIGURA 16.** Curva de crescimento e morte: (A) *Fusarium asiaticum*; (B) *F. meridionale* e (C) *Fusarium graminearum*; (ST) Sem tratamento; (Fasi, Fmer, Fgram), CIM (3,12  $\mu\text{g/mL}$ ), 2XCIM (6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e 4XCIM (12,48  $\mu\text{g/mL}$ ), tratadas com o Sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl

## 4.2 Testes *in vivo*

### 4.2.1 Análise qualitativa da incidência e severidade em plantas de

**trigo inoculadas** As plantas cultivadas em casa de vegetação sob temperatura e umidade controlada, foram analisadas visualmente quanto aos sintomas da doença (Figura 17).



**FIGURA 17.** Experimento em casa de vegetação com plantas de trigo apresentando sintomas da fusariose da espiga de trigo.

As testemunhas que foram inoculadas apenas com os esporos do patógeno apresentaram os sintomas típicos da doença, em média 100% de incidência da doença nas espigas e 94,6% de severidade nas espiguetas (Figura 18).



**FIGURA 18.** Sintomas da fusariose da espiga de trigo.

Considerando-se o índice da doença (ID), a comparação da testemunha com os demais tratamentos indicaram uma redução significativa da

doença, confirmando seu potencial fungicida *in vivo*. E indicando também, que o C<sub>16</sub>MImCl age tanto de forma preventiva como curativa nas plantas de trigo inoculadas.

Porcentagens ID entre tratamentos variaram de 0,02% (TebPrev 2g/L) a 41,55% (SI-CICur 0,5g/L) e a maior intensidade da doença foi observada na testemunha 94,06%. Entre os tratamentos com SI, considerável redução de ID foi observada com a aplicação de CIPrev 2g/L (0,51%) e CICur 2g/L (24,54%). O fungicida tebuconazol obteve menores índices de doenças em todos os tratamentos quando comparados com a testemunha (Tabela 6).

**TABELA 6.** Controle *in vivo* de *Fusarium graminearum* com aplicações preventiva e curativa em duas dosagens do C<sub>16</sub>MImCl e tebuconazol.

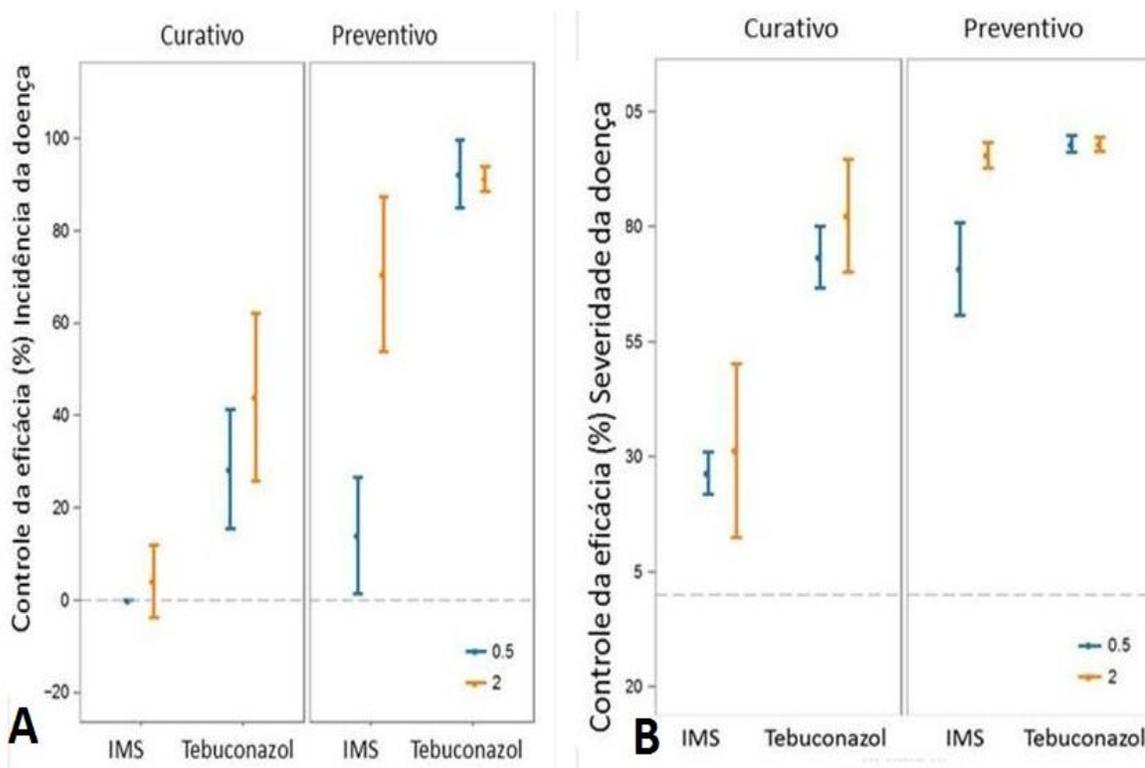
Experimento			
Tratamento <sup>1</sup>	Incidência <sup>2</sup>	Severidade <sup>3</sup>	Índice da doença (%) <sup>4</sup>
Controle	100	94,06	94,06
TebPrev2	2,54	0,83	0,02
SI-CIPrev2	17,55	2,88	0,51
TebPrev0,5	7,76	2,1	0,16
SI-CIPrev0,5	52,98	15,08	7,99
TebCur2	48	8,82	4,23
SI-CICur2	66,88	36,7	24,54
TebCur0,5	71	26	18,46
SI-CICur0,5	89,07	46,65	41,55

<sup>1</sup>1) Controle (não tratado); 2)TebPrev2 (tebuconazol-preventativo 2g/L); 3) SI-CIPrev2 (C<sub>16</sub>MImCl-preventativo 2g/L); 4) TebPrev0,5 (tebuconazol-preventativo 0,5g/L); 5) SI-CIPrev0,5 (C<sub>16</sub>MImCl-preventativo 0,5g/L); 6) TebCur2 (tebuconazol-curativo 2g/L); 7) SI-CICur2 (C<sub>16</sub>MImCl-curativo 2g/L); 8) TebCur0,5 (tebuconazol-curativo 0,5g/L); 9) SI-CICur0,5 (C<sub>16</sub>MImCl-curativo 0,5g/L). <sup>2</sup>Incidência (% de espigas infectadas) ; <sup>3</sup> Severidade (% de espiguetas infectadas); <sup>4</sup> Taxa de doença (expressa em percentual) =Incidência(%) x Severidade(%) / 100.

O teste de ANOVA mostrou significância para a interação dos três fatores (incidência, severidade e grãos infectados) ( $P < 0,05$ ), sugerindo que as médias foram dependentes do tratamento, antifúngico e dose.

No geral, as aplicações preventivas proporcionaram melhor controle do que aplicações curativas para as três variáveis relacionadas à doença avaliadas. As maiores reduções de doença em relação à testemunha (75% a 95%) para todas as variáveis foram verificadas nos tratamentos do tebuconazol e  $C_{16}MImCl$ , quando aplicados preventivamente na dose mais alta (2 g/L), não observando diferença significativa. Porém, neste mesmo tratamento, na dose mais baixa (0,5 g/L) diferiram estatisticamente.

As aplicações curativas de tebuconazol e  $C_{16}MImCl$  na dose mais elevada ainda proporcionaram bons níveis de eficácia de controle, especialmente para a severidade da doença. Contudo, em relação a concentração reduzida (0,5 g/L), especialmente em relação ao SI, foram observadas reduções de atividade para todos os parâmetros de doença testados (Figura 19.)



**FIGURA 19.** Médias e respectivos intervalo de confiança de 95% ( $n = 5$ ) expressos em percentual de redução na incidência da doença (A), severidade (B) em relação ao controle não tratado (100 % doença), por um SI ( $C_{16}MImCl$ ), e fungicida tebuconazol aplicados em duas dosagens (0,5 ou 2 g/L) antes (preventiva) e após (curativa) e inóculo de *F. graminearum*.

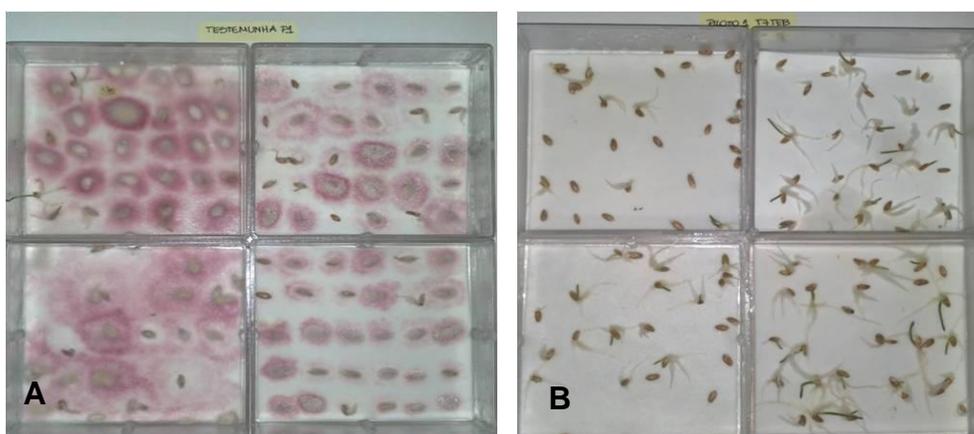
#### 4.2.2 Análise quantitativa de incidência da doença em grãos de trigo

Para a análise quantitativa, os grãos foram trilhados e separados conforme o tratamento, para posterior seleção aleatória dos grãos e confirmação da incidência da fusariose da espiga de trigo nos mesmos (Figura 20).



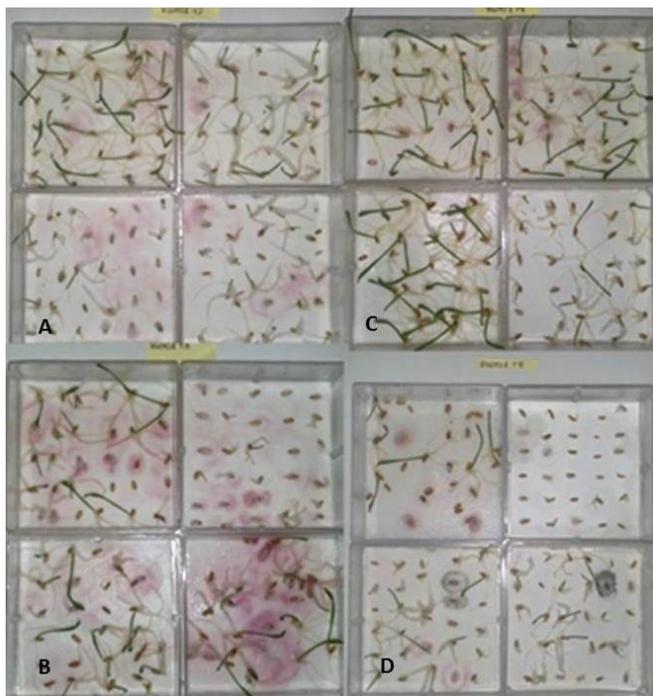
**FIGURA 20.** Grãos trilhados das plantas de trigo, separados conforme o tratamento.

Os resultados relacionados à testemunha, sem tratamento, após a incubação e quantificação indicaram 91% de incidência da doença. Estes resultados confirmam a manifestação da doença (Figura 21 A). A análise dos grãos relativos aos tratamentos curativo e preventivo (2 g/L) com o fungicida tebuconazol, após incubação, indicou ausência de crescimento micelial do fungo *F. graminearum*. Estes resultados confirmam os registrados pela análise visual da incidência da doença nas plantas de trigo (Figura 21 B).



**FIGURA 21.** A) Incubação de grãos de trigo infectados provenientes da testemunha que não recebeu nenhum tratamento fungicida e B) Grãos provenientes de plantas de trigo que receberam como tratamento o fungicida tebuconazol.

Após a incubação em câmara úmida (Figura 22), os resultados foram quantificados e calculados quanto à incidência, nos grãos testados.

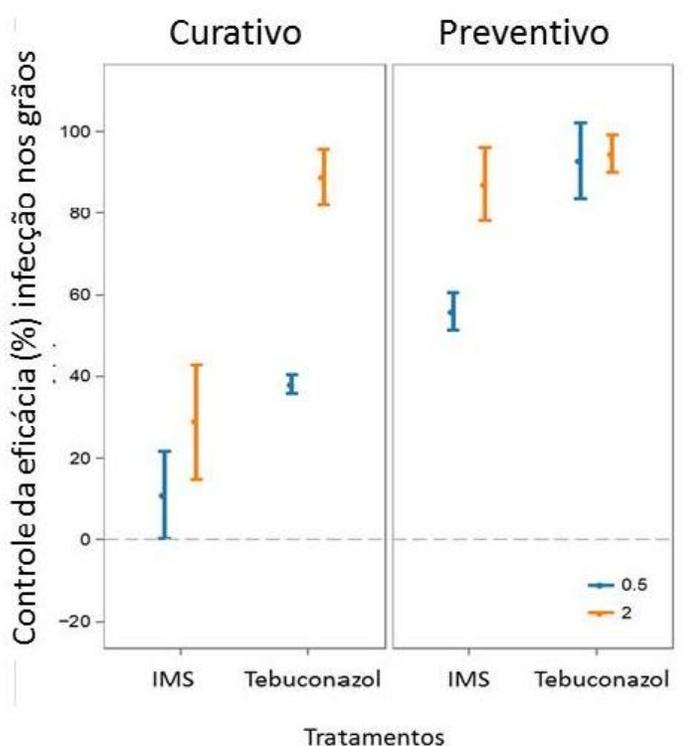


**FIGURA 22.** Sementes germinadas em câmara úmida. (A) Tratamento Curativo Si-Cl 2 g/L, (B) Tratamento Curativo Si-Cl 0,5 g/L, (C) Tratamento Preventivo tebuconazol 0,5 g/L e (D) Tratamento Preventivo tebuconazol 2 g/L.

Observou-se que o tratamento preventivo com o  $C_{16}MImCl$  nas dosagens de 2 g/L também reduziu significativamente o percentual de infecção da doença nos grãos de trigo, diferindo estatisticamente da testemunha e do tratamento curativo nas mesmas condições, como indicado pelas barras e respectivos intervalos de confiança. Estes dados confirmam os resultados anteriores de severidade e incidência nas plantas de trigo

Porém, quando comparado as médias dos valores dos tratamentos  $C_{16}MImCl$  preventivo na dose 2 g/L com o fungicida usual tebuconazol na dose 2

g/L, também não foram observadas diferenças estatísticas no índice de infecção dos grãos, indicando uma atividade de proteção contra a infecção do fungo nos grãos de trigo (Figura 23).



**FIGURA 23.** Medias e respectivo intervalo de confiança de 95% ( $n = 5$ ) expressos em percentual de redução de grãos infectados em relação ao controle não tratado (100 % doença). Tratados com SI ( $C_{16}MImCl$ ), e o fungicida tebuconazol aplicados em duas dosagens (0,5 ou 2 g/L) antes (preventiva) e após (curativa), inóculo de *Fusarium graminearum*.

#### 4.2.3 Análise de germinação em sementes tratadas com o sal imidazólico SI $C_{16}MImCl$

Os resultados da germinação das sementes indicaram que em média houve um total de 75,3% de emissão de plântulas das sementes quando tratadas com o SI em detrimento de apenas 21,7% de sementes não tratadas. O resultado

da análise de variância indicou efeito estatisticamente significativo (teste t de Student,  $p < 0,001$ ), indicando que os tratamentos diferiram significativamente (Tabela 7.). Estes resultados indicaram que o SI C<sub>16</sub>MImCl não prejudica a germinação das sementes.

**TABELA 7.** Médias de percentual de germinação que apresentaram influência significativa (teste de “t” de student,  $p < 0,05$ ) em relação a cada tratamento.

<b>Tratamentos</b>	<b>Número de sementes germinadas</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
Sementes tratadas com SI-Cl	226	18,83	3,56
Sementes sem tratamento	65	5,42	3,78
p-valor	<0,001		

Os valores apresentados correspondem às médias e desvios-padrão do percentual de germinação de correspondentes a três ensaios independentes em quadruplicata.

Durante o período emergência das plântulas não foi observado à ocorrência de fitotoxicidade, os coteóptilo apresentaram-se em geral verdes e bem desenvolvidos em comparação com as sementes não tratadas com o SI C<sub>16</sub>MImCl (Figura 24).

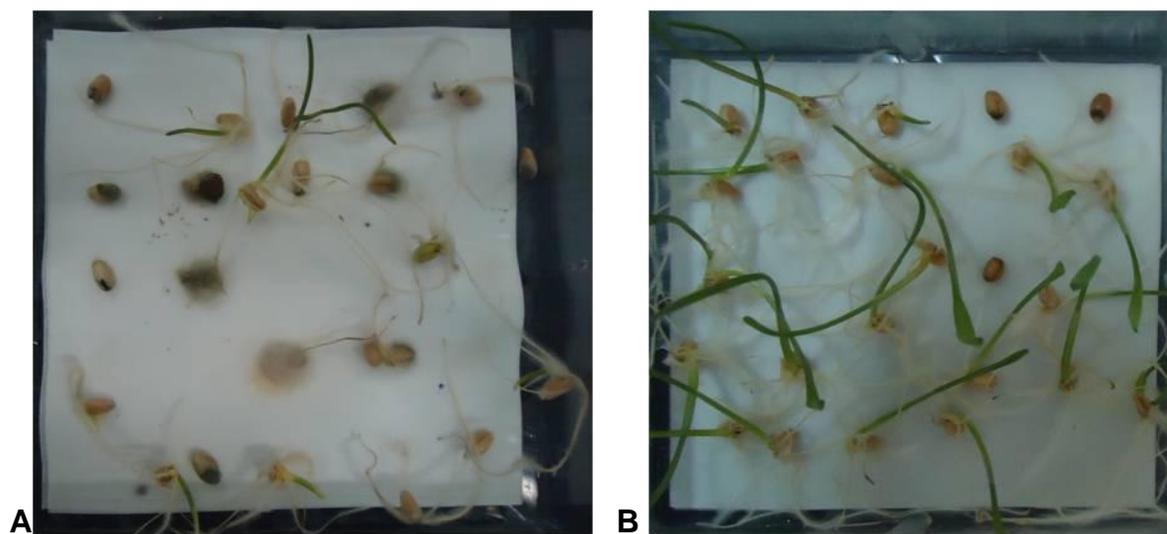


**FIGURA 24.** Análise de germinação (A) sementes tratadas com SI C<sub>16</sub>MImCl, (B) sementes sem nenhum tratamento.

Ainda em relação a análise das sementes, também foi observada a presença de contaminantes durante a incubação. Foi verificado que 79% das sementes que não foram tratadas apresentaram contaminação com fungos filamentosos.

As sementes tratadas com o sal imidazólico apresentaram apenas 1% de contaminação. Indicando hipoteticamente que o SI pode ter protegido a germinação das sementes contra a ação de fungos contaminantes (Figura 25), o

que explica a diferença significativa nos valores de germinação das sementes entre os dois tratamentos.



**FIGURA 25.** Presença de contaminantes durante a germinação das sementes não tratadas (A) e Ausência de contaminantes nas sementes tratadas com o SI-CI (B).

## 5 DISCUSSÃO

Os SI têm atraído significativo interesse comercial e científico especialmente no campo da medicina, no qual o efeito antimicrobiano tem sido comprovado em pesquisas com espécies patogênicas de bactérias gram-negativas e gram-positivas (Elshaarawy & Janiak, (2014), fungos, leveduras (Bergamo et al., 2015; Liu et al., 2013; Petkovic et al., 2009,) e protozoários (Faral-Tello et al., 2014).

Considerando que na literatura são escassas as informações destes compostos como agentes de fitossanitários (Pernak et al., 2013; Bica et al., 2011), nesta pesquisa foi explorado o potencial e aplicação dos SI como fungicidas agrônômicos para o controle de CEFG.

A estratégia de estudo foi a seleção para pesquisa de SI somente com longa cadeia hexadecílica (C16) e diferentes ânion (MeS, Cl, NTf<sub>2</sub>), previamente testados no controle de fungos de importância médica (Bergamo et al., 2015; Dalla Lana et al., 2015; Schrekker et al., 2013).

Desta forma, o estudo mostrou que o SI com longa cadeia hexadecílica (C16) e o ânion Cl, apresentou os melhores resultados *in vitro* e *in vivo* para o controle de três espécies micotoxigênicas de *Fusarium*, e em níveis comparáveis

ao fungicida tebuconazol. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a demonstrar o uso bem sucedido de SI para o controle de *Fusarium graminearum* agente etiológico de doenças que afetam o trigo.

O papel do ânion também indica diferenças na eficácia do contra-íon presente em cada molécula, de tal modo que o efeito antifúngico contra as espécies do complexo *F. graminearum* ocorreu na seguinte ordem: Tf<sup>2</sup>N < MeS < Cl, destacando uma melhor atividade anti-fúngica da molécula com o ânion cloreto. O efeito da inibição microbiana segundo o trabalho de Wang et al., (2011) também dependeu do tipo de ânion em cada composto para a eficácia da ação, obedecendo a seguinte relação: Tf<sup>2</sup>N ≥ PF<sub>6</sub><sup>-</sup> > BF<sub>4</sub><sup>-</sup> > CF<sub>3</sub> > COO<sup>-</sup> > MeS.

Schrekker et al., (2013), também selecionou o ânion Cl como o melhor espectro antifúngico entre outros ânions testadas (BF<sub>4</sub>( F<sub>3</sub>CSO<sub>2</sub>)<sup>2-</sup>), (H<sub>3</sub>CSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). Liu et al., (2012), provou intensa atividade antimicrobiana de biomembranas com oligômeros de SI com ânion cloreto, envolvido em amplo espectro de ação contra fungos e bactérias.

Embora o papel do ânion na molécula ainda esteja sendo elucidado, há a possibilidade de que o ânion cloreto com menor massa e carga possa de algum modo favorecer a interação do composto com as células fúngicas, facilitando a capacidade antifúngica da cadeia hexadecílica, causando um efeito antifúngico mais pronunciado contra fungos filamentosos (Dalla Lana et al., 2015).

Neste estudo, entre os sais imidazólicos avaliados, o SI C<sub>16</sub>MImCl teve sua ação destacada no conjunto de testes. Dalla Lana et al., (2015), também verificou forte atividade antifúngica do SI C<sub>16</sub>MImCl *in vitro*, gerando um sistema

de desagregação e desidratação das hifas de dermatófitos multiresistentes a drogas.

Portanto, observando-se a composição estrutural da molécula de C<sub>16</sub>MImCl, pode-se sugerir que a ação antifúngica ocorra neste caso, pela combinação de ambas características, anel imidazólico catiônico hidrofílico com a cadeia lateral hidrofóbica de 16 átomos de carbono e o ânion cloreto, explicação também suportada por outros autores (Dalla Lana et al., 2015; Pernak et al., 2003).

As concentrações mínimas inibitórias (CIM) dos SI C<sub>16</sub>MImCl, C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>16</sub>MImNTf<sub>2</sub>, apresentaram médias que variaram de 3,1 a 6,2 µg/mL. Outros estudos utilizando SI N-substituído apresentaram atividade antimicrobiana contra microrganismos, em faixas de CIM variáveis de 0,014 a 100,00 µg/mL (Odzak et al., 2013; Liu et al., 2013; Bergamo et al., 2015), sugerindo que a ação possa ter certa especificidade dependendo do sal imidazólico e microorganismo avaliado.

Os valores de CE<sub>50</sub> para as espécies do complexo *F. graminearum* foram determinados com base no crescimento micelial dos fungos em concentrações de 0,316 g/L para o SI e de 0,006 g/L para o tebuconazol. Os valores superiores do C<sub>16</sub>MImCl em relação ao tebuconazol contrasta com os valores similares de CIM determinado por método que expõe os conídios em solução e contato direto com o antifúngico e que age inibindo a germinação. Essa diferença sugere que os componentes do SI responsável pela ação fungicida agem de forma mais eficaz contra a germinação dos esporos, do que nas hifas.

Essas diferenças podem ser explicadas por diferenças no sistema regulatório dos fungos (Harris, 2005) e especialmente na composição dos conídios em comparação com a parede celular das hifas, que são inerentemente mais resistentes aos antifúngicos que as formas conidiais.

Essas observações são coerentes com outros estudos que também verificaram discrepâncias de resultados de suscetibilidade a agentes antifúngicos entre hifas e conídios em outras espécies de *Fusarium* (Lionakis et al., 2003) e *Aspergillus* spp. (Guarro et al., 1997).

As diferenças de eficácia entre os tratamentos poderiam ainda ser explicadas pelos mecanismos de ação dos SI, mas estes ainda estão sendo elucidados, e ainda não há evidência sobre a translocação sistêmica dos SI em plantas de trigo. Porém, a ação do SI no experimento de CIM parece ser mais similar ao modo de ação de fungicidas do grupo das estrobilurinas (Abril et al., 2008) do que os triazóis, que tem demonstrado efeito de inibição do crescimento micelial de *Fusarium* spp. (Shin et al., 2014).

Por outro lado, estudos tem sugerido semelhança do modo de ação de SI com os imidazóis e triazóis que atuam na inibição da biossíntese do ergosterol (Schrekker et al., 2013) ou mesmo a interferência no equilíbrio osmótico da célula (Hirayama et al. 2012).

No ensaio de tempo de morte (Time Kill Assay), o uso de concentração quatro vezes o valor do CIM mostrou efeito fungicida na primeira hora de ação para todos os isolados, o que é uma característica desejável, uma vez que tebuconazol apresenta efeito fungistático (Yin et al., 2009). Em plantas, o efeito

fungistático resulta em supressão temporária do desenvolvimento da doença por certo período de tempo, podendo progredir posteriormente (Becher et al., 2010; Spolti & Del Ponte, 2012).

O efeito fungistático retarda o desenvolvimento da doença mantendo os valores de severidade mais baixos na primeira semana, mas que ao longo do tempo pode atingir níveis consideráveis da doença. Havendo também a possibilidade de correlação entre acumulação de diferentes micotoxinas em grãos de trigo e o efeito fungistático dos triazóis (Spolti & Del Ponte 2012, Becher et al., 2010).

A inferência de que o SI C<sub>16</sub>MImCl seja um fungicida preventivo que atua primariamente na germinação dos esporos, também encontra suporte nos ensaios de eficiência de controle da fusariose da espiga de trigo. Onde as aplicações preventivas, ou seja, antes da inoculação, e na dose mais alta (2 g/L) proveram excelente redução de três variáveis da doença (incidência, severidade e grãos infectados), em níveis similares ao do fungicida comercial.

A redução da severidade, mas especialmente de grãos infectados, é de grande importância devido a sua relação com o rendimento do grão, além dos níveis de micotoxinas (Casa et al., 2004; Nicolli et al., 2015).

O fungo *F. graminearum* possui pouca habilidade de sobreviver na forma de micélio, formando rapidamente macroconídios e ascósporos, tendendo a diminuir acentuadamente sua biomassa, a fim de reduzir a necessidade de nutrientes para sua manutenção (Khongsa & Sutton, 1988).

Neste cenário, a ação preventiva vem a refletir diretamente no controle

da doença, os esporos encontrados abundantemente na natureza, são estruturas reprodutivas e significantes veículos de colonização das plantas, de modo que a inibição da germinação de esporos é essencial para o controle químico de vários fitopatógenos (Shin et al., 2014).

No caso das espécies do complexo de espécies *F. graminearum* os esporos possuem quitina nos ápices dos esporos e em regiões corticais de células macroconidial, que posteriormente produzem o tubo germinativo. O padrão espacial da morfogênese requer a presença de microtúbulos funcionais, que podem ser responsáveis pelo transporte de fatores-chave de polaridade para sites específicos que possui um sistema regulatório que marca locais de emergência do tubo germinativo (Harris, 2005).

Hipoteticamente, de alguma forma este sistema é perturbado pelo C<sub>16</sub>MImCl representando uma abordagem eficaz que impede a germinação e colonização de superfícies da planta hospedeira.

A interferência na capacidade de germinação dos macroconídios de *F. graminearum*, impedindo a aderência no tecido do hospedeiro, presumivelmente, representa um papel significativo não somente no controle da fusariose da espiga do trigo, mas na redução dos níveis de DON. Visto que o mesmo é sintetizado principalmente nas pontas das hifas, que avançam no espaço intercelular, enquanto as defesas das plantas são inibidas pelo DON (Brown et al., 2011).

Em geral, os DMIs (inibidores da biossíntese de esteróis), especificamente os triazois (tebuconazol, metconazol e protioconazol) são considerados os fungicidas químicos mais eficazes contra o CEFV na redução da

incidência da fusariose da espiga do trigo (Paul et al., 2008; Becher et al., 2011), no entanto, pode causar danos à saúde humana e ambiental (Menegola et al., 2006).

Assim, a utilização de substâncias de nula ou baixa toxicidade seria de questão urgente e considerável, para formulação de novos fungicidas. Neste sentido, o C<sub>16</sub>MImCl foi testado por um conjunto de testes toxicológicos envolvendo mutagênese, genotoxicidade e instabilidade cromossômicas em células de leucócitos humanos, não indicando nenhum dano no DNA humano nas concentrações avaliadas (Schrekker et al., 2013; Dalla Lana et al., 2015).

Neste estudo, também foi avaliada a aplicação do C<sub>16</sub>MImCl na germinação das sementes. Os resultados indicaram uma melhora na germinação quando as sementes foram tratadas com o SI C<sub>16</sub>MImCl, não havendo interferência negativa da substância. A diferença na taxa de germinação das sementes tratadas, em detrimento às testemunhas sem tratamento pode estar relacionado a um efeito protetor do SI, impedindo os fungos de infectarem as plântulas durante a germinação.

Portanto, a desinfestação das sementes de trigo previamente a germinação com o SI-Cl pode representar uma alternativa viável e vantajosa para o tratamento de sementes de fungos de pré e pós-colheita. A presença de fungos patogênicos em sementes após o ponto de maturidade fisiológica, ou durante o armazenamento, faz com que ocorra a redução do potencial fisiológico e baixa na qualidade sanitária mais rapidamente (Barbosa et al., 2013). Além de interferirem no poder germinativo, no início do desenvolvimento de plântulas e posteriormente

transmissão do patógeno para a parte aérea e sistema radicular da planta (Muniz et al., 2004).

O tratamento químico é o método mais comum de se tratar sementes, de grande valor comercial, e deve ser baseado na existência de produtos eficientes contra os patógenos, mas pouco tóxicos aos homens, ambiente, e de baixa fitotoxicidade, não interferindo no aparato fotossintético das plantas (Dias, 2012).

Durante o processo de germinação das sementes tratadas com o SI, não foram observados sinais e fitotoxicidade nas plântulas emergidas durante todo o período de avaliação. Estudos envolvendo o fungicida usual tebuconazol indicaram valores significativamente inferiores na altura das plantulas após emergência em relação à testemunha (Garcia et al., 2008).

O uso de triazóis em experimento realizado por Balardin & Facco (2003), também, mostrou efeito negativo na altura de plântulas de trigo após 14 dias de emergência. Tebuconazol, como vários outros triazóis, pode ter um efeito fitotóxico sobre as plantas, aplicações excessivas podem causar danos às sementes e reduzir a germinação pela inibição da síntese de giberelina (Rademacher, 2000). Hormônios giberelina desempenham um papel vital ao longo do desenvolvimento da planta, e são vitais para processos como a germinação de sementes, caule indução floral alongamento, anteras e desenvolvimento de sementes e crescimento do pericarpo (Miransari & Smithc, 2014).

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- O sal imidazólico C<sub>16</sub>MimCl (SI-Cl) apresentou os melhores resultados *in vitro* apresentando significativos valores de CIM (3,1 µg/mL) e CE<sub>50</sub> (0,316 g/L) para todos os isolados testados.
- Foi definido que o SI-Cl atua como uma substância fungicida na concentração de 4XCIM, (12,48 µg/mL), desde a primeira hora de incubação, não dependendo do tempo nesta concentração.
- As aplicações preventivas (2 g/L) com SI-Cl proporcionou melhor controle do que as curativas para as três variáveis relacionadas à doença avaliadas, não diferindo do fungicida usual.
- O tratamento de sementes de trigo com a dose (2 g/L) do SI-Cl agiu positivamente no índice de germinação, não causando fitotoxicidade nas plântulas.
- Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam pela primeira vez a ação de SI em fungo fitopatogênico com potencial micotoxigênico *in vitro*, e *in vivo* em espigas de trigo.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Em futuros estudos seria intuitivo testar o efeito de aplicações posteriores ao florescimento de forma a proteger a cultura por períodos prolongados, uma vez que há a contribuição de infecções tardias causando danos nos grãos e aumentando níveis de micotoxinas.
- Poderia-se avaliar os SI em condições de campo na redução de níveis de micotoxinas, principal preocupação atual dos produtores em relação à fusariose da espiga de trigo, devido a legislação que regulamenta níveis máximos tolerados,
- Verificar a sistemicidade do SI, e possíveis modificações estruturais nessas moléculas, o que poderia conferir características desejáveis ao fungicida.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL, M.; CURRY, K. J.; SMITH, B. J.; WEDGE, D. E. Improved microassays used to test natural product-based and conventional fungicides on plant pathogenic fungi. **Plant Disease**, v.92, p.106-112. 2008.

ANDERSON, E.B.; LONG, T.E. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. **Polymer**, v. 51, p. 2447–2454, 2010.

ANDREWS JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.5–16. 2001.

ANDEF. 2010. **Manual de uso correto e seguro de produtos fitossanitários – Agrotóxicos**. São Paulo. Linea criativa. 28p.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.

ASTOLFI, P.; DOS SANTOS, J.; SCHNEIDER, L.; GOMES, L. B.; SILVA, C. N.; TESSMANN, D.; DEL PONTE, E. M. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in southern Brazil. **International Journal Food Microbiology**, v.15, n.3, p.197-201, 2011

ASTOLFI, P.; REYNOSO, M.M.; RAMIREZ, M.L.; CHULZE, S.N.; ALVES, T.C.A.; TESSMANN, D.J.; DEL PONTE, E.M. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathology**, v.61, p.289–295, 2012.

ARMAND, M.; ENDRES, F.; MACFARLANE, D. R.; OHNO, H.; SCROSATI, B. Ionic - liquid materials for the electrochemical challenges of the future. **Nature Materials**, v.8, p.621-629, 2009.

AZEVEDO, L. A. S. **Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional**. 320p. Campinas: EMOPI Editora e Gráfica. 2003.

BALARDIN, R. S.; FACCO, M. J. Eficiência e fitotoxicidade de fungicidas no controle de *Helminthosporium sativum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum*) cultivar BR 23. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, supl., p. 276, 2003.

BARBOSA, R. M.; Santos, J. S.; Lopes, M. M.; Panizzi, R. C.; Vieira, R. D. Chemical control of pathogens and the physiological performance of peanut seeds. **International Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 11, n. 2, p. 322-326, 2013.

BUSHNELL, W. R.; HAZEN, B. E.; PRITSCH, C **Histology and physiology of Fusarium head blight**. In KJ Leonard, WR Bushnell, eds, *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. APS Press, St. Paul, MN, 2003. pp 44–83

BECKER, R.; WIRSEL, S. G. R. Fungal cytochrome P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, n. 4, p. 825-840, 2012.

BECHER, R.; HETTWER, U.; KARLOVSKY, P.; DEISING, H. B.; WIRSEL, S. G. R. .Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. **Phytopathology**, v.100, p.444-453, 2010.

BECHER, R.; WEIHMANN, F.; DEISING, H. B.; WIRSEL, S. G. R. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. **BMC Genomics**, v.12, p.1-52 2011.

BERGAMO, V. Z.; DONATO, R. K.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, K. J.; ORTEGA, G. G.; SCHREKKER, H. S.; FUENTEFRIA, A. M. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Letters Applied Microbiology**, v.60, p.66-71, 2015.

BICA, K.; COOKE, L. R.; NUGENT, P.; RIJKSEN, C.; ROGERS, R. D. Toxic on purpose: ionic liquid fungicides as combinatorial crop protecting agents. **Green Chemistry**, v. 13, p.2344-2346, 2011.

BICZAK, R.; PAWLOWSKA, B.; BALCZEWSKI, P.; RYCHTER, P. The role of the anion in the toxicity of imidazolium ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**. p.1-25. 2014.

BOWDEN, R. L.; LESLIE, J. F. Sexual recombination in *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, v. 89, p.182–188, 1999.

BOOTH, C. **The Genus *Fusarium*. Kew: Survey**, C.M.I.. 1971, 238p.

BOTTALICO, A.; PERRONE, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.611-624. 2002.

BRENT, K. J. Fungicide resistance in crop pathogens, how can it be managed? Brussels Belgium. **Global Crop Protection Federation**. 1995.

BRENT, K. J.; HOLLOMON D. W. **Fungicide Resistance In Crop Pathogens: How Can It Be Managed?** Revised edition FRAC, 2006, 60 p.

BROWNE, R. A.; COOKE, B. M. Resistance of wheat to *Fusarium* spp. in an *in vitro* seed germination assay and preliminary investigations into the relationship with *Fusarium* head blight resistance. **Euphytica**, v.141, v.1-2 , p.23-32, 2005.

BROWN, N. A.; URBAN, M.; VAN DE MEENE, A. M. L.; HAMMOND-KOSACK, K. E. The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. **Fungal Biology**, v.114, p. 555–571. 2010.

BROWN, N. A., BASS, C., BALDWIN, T. K., CHEN, H., MASSOT, F., Carion, P. W. C., Urban, M., van de Meene, A.M.L., Hammond-Kosack, K.E. Characterisation of the *Fusarium graminearum*-wheat floral interaction. **Journal of Pathogens**, v. 2011, p.1-9, 2011.

BRUNTON, L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B.C. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12thEdition, Ed. McGrawHill, 2012.

BUERSTMAYR, H.; BAN, T.; ANDERSON, J. A. Q. T. L. Mapping and marker-assisted selection for fusarium head blight resistance in wheat: a review. **Plant Breed**, v.128, p.1–26, 2009.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento. Conjunturas agropecuárias**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/in dicadores 0205\\_balanca\\_exportacao.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/in_dicadores_0205_balanca_exportacao.pdf)>. Acesso em: maio de 2015.

CARSON, L.; CHAU, P. K. W.; EARLE, M. J.; GILEA, M. A.; GILMORE, B. F.; GORMAN S. P. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Green Chemistry**, v.11, p. 492–497. 2009.

CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, n.9, p.685-692, 2003.

CAVINDER, B.; SIKHAKOLLI, U.; FELLOWS, K. M.; TRAIL, F. Sexual Development and Ascospore Discharge in *Fusarium graminearum*. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**. v.61, p.3791-3895, 2012.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; BLUM, M. M. C.; BOGO, A.; SCHEER, O.; ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 289-293. 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, 2nd ed, CLSI document M38-A2, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2008.

CHEN, Y., WANG, J.-X., ZHOU, M.-G., CHEN, C.-J., AND YUAN, S.-K. 2007. Vegetative compatibility of *Fusarium graminearum* isolates and genetic study on their carbendazim-resistance recombination in China. **Phytopathology**. v. 97, p.1584-1589, 2007a.

CHEN, C.; WANG, J.; LUO, Q.; YUAN, S.; ZHOU, M. Characterization and fitness of carbendazim-resistance strains of *Fusarium graminearum* (Wheat scab). **Pest Management Science**, v.63, p.1201-1207, 2007b.

CHEN, F. P.; FAN, J. R.; ZHOU, T.; LIU, X. L.; LIU, J. L.; SCHNABEL, G. Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. **Plant Disease**, v.96, p.416-422, 2012.

CONSORTI, C. S.; SOUZA, R. F.; DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução. **Química Nova**, v.24, n.6, p. 830-837, 2001.

COOLS, H. J.; BAYON, C.; ATKINS, S.; LUCAS, J. A.; FRAAIJE, B. A. Overexpression of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (*MgCYP51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. **Pest Management Science**, v. 68, p.1034-1040, 2012.

CORNELLAS, A.; PEREZ, L.; COMELLES, F.; RIBOSA, I.; MANRESA, A.; GARCIA, M. T. Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution, **Journal Colloid Interface Science**, v.355, p.164-171, 2011.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. I.; FERNÁNDEZ, J. L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOSÁLBEZ, A.; GOSÁLVEZ, J. Application of the Comet Assay: Chromosome–Comet Assay. **Journal of histochemistry & cytochemistry**, v. 59, n.7, p. 655–660, 2011.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (2003) **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems, Task Force Report.** Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA.

COPPING, L. G. “**Review of major agrochemical classes and uses,**” in ***Chemistry and Technology of Agrochemical Foundations***, D. A. Knowles, Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998. p. 29.

DALLA LANA, D. F.; DONATO, R. K.; BUNDCHEN, C.; GUEZ, C. M.; BERGAMO, V. Z.; OLIVEIRA, L. F. S.; MACHADO, M. M.; SCHREKKER, H. S.; FUENTEFRIA, A. M. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p.377-388, 2015.

DEBUCHY, R.; TURGEON, B. G. **Mating-type structure, evolution, and function in Euscomycetes.** *The Mycota* (Kues U., Fischer R., eds), pp. 293–323, 2006.

DEETLEFS, M.; KENNETH, A.; SEDDONA, R.; SHARAB, M. **Predicting physical properties of ionic liquids**, v.8, p.642-649, 2006.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PEIL, A.; WEBER, W. E. **Disease management of rusts and powdery mildews**, in *The Mycota XI. Application in Agriculture*, Kempken, F., Editor. Springer: Berlin. p.243-269, 2002.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R.; BERGSTROM, G. C. fusariose da espiga de trigo do Trigo - Aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p.587-605, 2004.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; BERGSTROM, G. C. Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. **Journal of Phytopathology**, v.155, p.577-581, 2007.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PAVAN, W., BAETHGEN, W. E. A Model-based Assessment of the Impacts of Climate Variability on *Fusarium* Head Blight Seasonal Risk in Southern Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.157, p. 675–681. 2009.

DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to fusarium head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v.132, p.1087-1091, 2012.

DEL PONTE, E. M.; SPOLTI, P.; WARD, T. J.; GOMES, L. B.; NICOLLI, C. P.; KUHNEM, P. R., SILVA, C. N., TESSMANN, D.J. Regional and field-specific

factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, v.105, p. 246-254. 2015.

DELP, C.J. "**Benzimidazole and related fungicides,**" in **Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanisms of Action**, H. Lyr, Ed. Wiley, New York, NY, USA. 1987, p. 233–244.

DE LUCA, L. Naturally occurring and synthetic imidazoles: their chemistry and their biological activities. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, p.1-23, 2006.

DEMBERELNYAMBA, D.; KIM, K. S.; CHOI, S.; PARK, S.Y.; LEE, H.; KIM, C. J.; YOO, I. D. Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, n.5, p.853-857, 2004.

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H.; BAI, G.; MCCORMICK, S. P.; SHANER, G.; BEUCHLEY, G.; HOHN, T. M. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.9, p.775-781.1996.

DESJARDINS AE. ***Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology.** The American Phytopathological Society; St. Paul, Minnesota, USA: 2006. p. 260.

DESJARDINS A. E., PROCTOR R. H. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. **Fungal Biology**, v.115, p.38-48, 2011.

DESJARDINS, A.E. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, p.7587-7592, 2008.

DEXTER, J. E.; NOWICKI, T. W. **Safety assurance and quality assurance issues associated with fusarium head blight in wheat.** In: LEONARD, K. J.; BUSHNELL, W. R. (Ed.). *Fusarium head blight of wheat and barley*. St. Paul: APS Press, 2003. p. 420-460.

DIAS, M. C. "Phytotoxicity: An overview of the physiological responses of plants exposed to fungicides," **Journal of Botany**, v. 2012, p.1-4. 2012.

DOCHERTY, K. M.; KURPA, C. F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. **Green Chemistry**. v.7, p.185-189, 2005.

DUARTE, R. P., JULIATTI, F. C., FREITAS, P. T. Eficiência de diferentes fungicidas na cultura do milho. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n.4, p.101-111. 2009.

ELSHAARAWY, R. F. M.; JANIAC, C. Toward new classes of potent antibiotics: Synthesis and antimicrobial activity of novel metallosaldach–imidazolium salts. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.75, n.21, p. 31–42, 2014.

EPA, U.S. **Environmental Protection Agency**, USDA, U.S. Department of Agriculture. 92 *Apply pesticides correctly: a guide for private applicators*. Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, 2000.

ERIKSEN, G. S., PETTERSSON H., LUNDH, T. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. **Food and Chemical Toxicology** . v.42, p.619–624, 2004.

FARAL-TELLO, P.; LIANG, M.; MAHLER, G.; WIPF, P.; ROBELLO, C. Imidazolium compounds are active against all stages of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.43, p.262-268, 2014.

FAO. **Crop Prospects and Food Situation**. Rome: v.1, p. 1-42, 2015.

FERNÁNDEZ-ACERO, F. J.; CARBÚ. M.; EL-AKHAL, M. R.; GARRIDO, C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, V. E.; CANTORAL, J. M. Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. **International Journal of Molecular Sciences** v.12, p.795-816, 2011.

FERRAZ, R.; BRANCO, L. C.; PRUDÊNCIO, C.; NORONHA, J. P.; PETROVSKI, Ž. Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients. **Chemistry Medicinal Chemistry**, v.6, p. 975–985. 2011

FISCHER R, KÜES U. **Asexual sporulation in mycelial fungi**, p 263–292 In Kües U, Fischer R, editors. (ed), *The Mycota*, 2nd ed, vol 1 Growth, differentiation and sexuality Springer, Berlin, Germany, 2006.

FRADE, R.F.; AFONSO, C.A. Impact of ionic liquids in environment and humans: an overview. **Human & Experimental Toxicology Journal**, v29, v.12, p.1038-54, 2010.

FRAC. FRAC cod list©. **Fungicide sorted by mode of action**, 2007. Disponível em:< <http://www.frac.brasil.org.br>> Acesso em: 05 de Maio de 2015.

FRAC. FRAC cod list©. **List of Resistant Plant Pathogenic Organisms** - January 2007. Disponível em:< <http://www.frac.info>> Acesso em: 05 de Maio de 2015.

FRANZOI, A.C.; BRONDANI, D.Z.E.; MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas

metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1042-1050, 2011.

GAO, Y.; VLAHAKIS, J. Z.; SZAREK, W. A.; BROCKHAUSEN, I. Selective inhibition of glycosyltransferases by bivalent imidazolium salts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p.1305-1311. 2013.

GARCIA, J. D.; VECHIATO, M. H.; MENTEN, J. O. M. Efeito de fungicidas no controle de *Fusarium graminearum*, germinação, emergência e altura de plântulas em sementes de trigo. **Summa phytopathologica**, v.34, n.3, p. 280-283, 2008.

GUARRO, J.; LLOP, C.; AGUILAR, C.; PUJOL, I. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. **Antimicrobial. Agents Chemotherapy**, v.41, p.2760-2762. 1997.

GEISER, D. M.; AOKI, T.; BACON, C. W.; BAKER, S. E.; BHATTACHARYYA, M. K.; BRANDT, M. E.; BROWN, D. W.; BURGESS, L. W.; CHULZE, S.; COLEMAN, J. J.; CORRELL, J. C.; COVERT, S.F.; CROUS, P. W.; CUOMO, C. A.; DE HOOG, G.S.; DI PIETRO, A.; ELMER, W.H.; EPSTEIN, L.; FRANDSEN, R.J.; FREEMAN, S.; GAGKAEVA, T.; GLENN, A. E.; GORDON, T. R.; GREGORY, N. F.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; HANSON, L. E.; JÍMENEZ-GASCO, M.; DEL, M.; KANG, S.; KISTLER, H. C.; KULDAU, G. A.; LESLIE, J. F.; LOGRIECO, A.; LU, G.; LYSOE, E.; MA, L. J.; MCCORMICK, S. P.; MIGHELI, Q.; MORETTI, A.; MUNAUT, F.; O'DONNELL, K.; PFENNING, L.; PLOETZ, R. C.; PROCTOR, R. H.; REHNER, S. A.; ROBERT, V.A.; ROONEY, A.P.; BIN SALLEH, B.; SCANDIANI, M.M.; SCAUFLAIRE, J.; SHORT, D.P.; STEENKAMP, E.; SUGA, H.; SUMMERELL, B. A.; SUTTON, D. A.; THRANE, U.; TRAIL, F.; VAN DIEPENINGEN, A.; VANETTEN, H. D.; VILJOEN, A.; WAALWIJK, C.; WARD, T.J.; WINGFIELD, M.J.; XU, J.R.; YANG, X.B.; YLI-MATTILA T.; ZHANG, N. One Fungus, One Name: Defining the Genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use. **Phytopathology** v.103, n.5, p.400-408. 2013.

GILBERT, J.; FERNANDO, W. G. D. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae/Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 26, n. 4, p. 464-472, 2004.

GILBERT, J; HABER, S. Overview of some recent research developments in fusarium head blight of wheat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 35, p.149-174, 2013.

GUENTHER, J. C.; TRAIL, F. The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. **Mycologia**. v.97, p.229–237. 2005.

GLASS, N. L.; JACOBSEN, D.; SHIU, P. K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p.165-186, 2000.

GOMES, L. B.; WARD, T. J.; BADIALE-FURLONG, E.; DEL PONTE, E. M. Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. **Plant Pathology**, v.64, p.980-987.2015.

GOSWANI, R. S.; KISTLER, H. C. Heating for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.515-525. 2004.

GULSHAN, K.; MOYE-ROWLEY, W. S. Multidrug resistance in fungi. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p.1933- 1942, 2007.

HARRIS, S. D. Morphogenesis in germinating *Fusarium graminearum* macroconidia. **Mycologia**, v.97, p.880-88. 2005.

HALLEN, H.; TRAIL, F. The L-Type calcium ion channel Cch1 affects ascospore discharge and mycelial growth in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*) **Eukaryotic Cell**. v.7, p.415–424, 2008.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis** v.18, p.45-51. 2003.

IMURA, H. Evaluation of a hydrophilic ionic liquid as a salting-out phase separation agent to a water–tetrahydrofuran homogeneous system for aqueous biphasic extraction separation. **Analytical Sciences**, v.28, n.6, p.541-543, 2012.

HOLLINGSWORTH, C. R.; MOTTEBERG, C. D.; WIERSMA, J. V; ATKINSON, L. M. Agronomic and economic responses of spring wheat to management of fusarium head blight. **Plant Disease**, v.92, p.1339-1348, 2008.

HUANG, T. W.; PENG, K. C.; SHIH, H. N.; LIN, G. H.; CHANG, T. F.; HSU, S. J. 2011. Antimicrobial properties of ethoxyether-functionalized imidazolium salts. **Soft Matter**, v.7 p. 8392-8400, 2011.

HICKE, P. C.; JACOBSON, D. J.; READ, N. D.; GLASS, N. L. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology** v.37, p.109-119, 2002.

IWAI, N.; NAKAYAMA, K.; KITAZUME, T. Antibacterial activities of imidazolium, pyrrolidinium and piperidinium salts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, p. 1728–1730, 2011.

INDEXFUNGORUMURL.2015, Disponível em <[www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=550000](http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=550000)> Acesso em: 05 de junho de 2015.

JANSEN, C.; VON WETTSTEIN, D.; SCHÄFER, W.; KOGEL, K. H.; FELK, A.; MAIER, F. J. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichothecene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.102, p.16892–16897, 2005.

JUNG, B.; KIM, S.; LEE, J. Microcycle conidiation in filamentous fungi. **Mycobiology**, v.42, n.1, p.1-5, 2014.

KARAOGLANIDIS, G. S.; THANASSOULOPOULOS, C. C. Cross-resistance patterns among sterol biosynthesis inhibiting fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.929-934, 2003.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, v.118, p.417-423, 1988.

KLIX, M. B.; VERREET, J-A; BEYER, M. Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. **Crop Protection**, v. 26, p.683-690. 2007.

KHONGA, E. B.; SUTTON, J. C. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 10, p. 232-239, 1988.

LÁDAY, M.; JUHÁSZ, Á.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; SZÉCSI, Á.; LOGRIECO, A. Mitochondria DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.545-550, 2004.

LEE, T.; HAN, Y. K.; KIM, K. H.; YUN, S H.; LEE, Y. W. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2148–2154. 2002

LEE, J.; LEE, T.; LEE, Y.-W.; YUN, S.-H.; TURGEON, B. G. Shifting fungal reproductive mode by manipulation of mating type genes: obligatory heterothallism of *Gibberella zeae*. **Molecular Microbiology**, v.50, p.145-152. 2003.

LEE, S. G. Functionalized imidazolium salts for task-specific ionic liquids and their applications. **Chemical Communications**, v.104, p.9-1063, 2006.

LEE, J.; CHANG, I. Y.; KIM, H.; YUN S. H.; LESLIE, J.; LEE, Y. W. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.3289-3295, 2009.

LEE J.; KIM H., JEON J. J., KIM, H. S.; ZELLER, K. A.; CARTER, L. L. A.; LESLIE, J. F.; LEE, Y. W. Population structure of and mycotoxin production by *Fusarium graminearum* from maize in South Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78: p.2161–2167, 2012.

LEPLAT, J.; FRIBERG, H.; ABID, M.; STEINBERG, C. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of fusarium head blight. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 1, p.97-111, 2013.

LEROUX, P.; ALBERTINI, C.; GAUTIER, A.; GREDT, M.; WALKER, A.S. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 alpha-demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, v.63, p.688-698, 2007.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B.A. The *Fusarium* laboratory workshops- A recent history. **Mycotoxin Research, Coverage**, v. 22, n. 2, p. 73-74, 2006.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of E test, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.345-351, 2002.

LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E.; SAMONIS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. Pentamidine is active *in vitro* against *Fusarium* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n.47, p.3252-3259. 2003.

LIU, L.; HUANG, Y.; RIDUAN, S. N.; GAO, S.; YANG, Y.; FAN, W. Main-chain imidazolium oligomer material as a selective biomimetic antimicrobial agent. **Biomaterials**, v.33, p. 8615–8622. 2012.

LIU, L.; WU, H.; RIDUAN, S. N.; YING, J. Y.; ZHANG, Y. Short imidazolium chains effectively clear fungal biofilm in keratitis treatment. **Biomaterials**, v.34, n.4, p.1018-1023, 2013.

LIS, R.; DAVEY, D. D.; MORGAN J. R. T. K.; LUMMA, J. R. W. C.; WOHL, R. A.; JAIN, V. K.; WAN, C. N.; ARGENTIERI, T. M.; SULLIVAN, M. E.; CANTOR, E. H.

Synthesis and antiarrhythmic activity of novel 3-alkyl-1-[omega.-[4 [(alkylsulfonyl)amino]phenyl]-omega. hydroxyalkyl]-1H-imidazolium salts and related compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.30, p.2303-2309.1987.

LYSOE, E.; PASQUALI, M.; BREAKSPEAR, A.; KISTLER, H. C. The transcription factor FgStuAp influences spore development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 24, p.54–67, 2011.

MALHOTRA, S. V.; KUMAR, V. A profile of the *in vitro* anti-tumor activity of imidazolium-based ionic liquids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p.581-585.2010.

MARTINS, E. R.; KEMMELMEIER, C. Zearalenone production in *Fusarium graminearum* variants after treatment with nitrosoguanidine. **Revista de Microbiologia**. v. 24, p. 248-254, 1993

MELETIADIS, J.; MEIS, J. F.; MOUTON, J. W.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. **Comparison of NCCLS** and 3-(4,5-dimethyl-2-Thiazyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, n.8, p2949-2954, 2000.

MCMULLEN, M.; BERGSTROM, G.; WOLF, E. D.; DILL-MACKY, R.; HERSHMAN, D.; SHANER, G.; VAN SANFORD, D. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. **Plant Disease**, St. Paul, v.96, p.1712-1728, 2012

MENEGOLA, E.; BROCCIA, M. L.; DI RENZO, F.; GIAVINI, E. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects reproductive. **Toxicology**, v.22, p.186-195. 2006.

MICHELL, B. B.; SIINGI, S.M. **Selected Methods in cellular immunology**. Freeman W.H. Company, San Francisco, 1980.

MILLER, J. D., GREENHALGH, R., WANG, Y. Z., LU, M. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. **Mycologia**, v.83, p.21-130, 1991.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v.99, p.110–121, 2014.

MOSS, M. O.; THRANE, U. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation., **Toxicology Letters** v.153, p.23-28, 2004.

MUNIZ, M. F. B. et al. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 2, p. 144-149, 2004.

**MYCOBANK** URL– Disponível em:< [http://www.mycobank.org/Myco\\_Taxo.aspx?Link=T&Rec=550000](http://www.mycobank.org/Myco_Taxo.aspx?Link=T&Rec=550000) > Acesso em: 25 de junho de 2015.

NATESAN, S. K.; CHANDRASEKAR, P. H.; ALANGADEN, G. J.; MANAVATHU, E. K. Fluvastatin potentiates the activity of caspofungin against *Aspergillus fumigatus* *in vitro*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v.60, p.69-73. 2008.

NESIC, K.; IVANOVIC, S.; NESIC V. *Fusarial* toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.228, p.101-20, 2014.

NEVES, W.S.; PARREIRA, D.F.; FERREIRA, P.A.; LOPES, E.A. avaliação fitossanitária de sementes de pinhão-manso provenientes dos vales do jequitinhonha e mucuri revista trópica, **Ciências Agrárias e Biológicas**, v.3, n. 2, p.1-18, 2009.

NELSON, P. E., T. A. TOUSSON T. A.; MARASAS, W. F. O. 1983 ***Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification**. State University Press, University Park, PA.

NICOLLI, C. P., SPOLTI, P., TIBOLA, C. S., FERNANDES, J. M. C., DEL PONTE, E. M. *Fusarium* head blight and trichothecene production in wheat by *Fusarium graminearum* and *F. meridionale* applied alone or in mixture at post-flowering. **Tropical Plant Pathology**. v. 40, p.134-140. 2015.

NIELSEN, L. K.; JENSEN, J. D.; NIELSEN, G. C.; JENSEN, J. E.; SPLIID, N. H.; THOMSEN, I. K.; JUSTESEN, A. F.; COLLINGE, D. B.; JORGENSEN, L. N. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. **Phytopathology**, v.101, n.8, p.960-9, 2011.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C.; TACKE, B.K.; CASPER, H.H. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.7905-7910, 2000.

O'DONNELL, K.; WARD, T.J.; GEISER, D.M.; KISTLER, H.C.; AOKI, T. Genealogical concordance between mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**. v.4, n.41, p.600-623, 2004.

O'DONNELL, K.; WARD, T.J.; ABERRA, D.; KISTLER, H.C.; AOKI, T.; ORWIG, N.; KIMURA, M.; BJORNSTAD, A.; KLEMSDAL, S.S. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. **Fungal Genetics and Biology**, v.45, p.1514–1522, 2008.

ODŽAK, R.; SKOČIBUŠIĆ, M.; MARAVIĆ, A. Synthesis and antimicrobial profile of N-substituted imidazolium oximes and their monoquaternary salts against multidrug resistant bacteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p.7499-7506. 2013.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v.144, 31-43, 2006.

PARRY, D.W., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. **Plant Pathology**, v.44, p.207-238,1995.

PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela fusariose da espiga de trigo em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.189-192. 2003a.

PAUL, P. A.; LIPPS, P. E.; HERSHMAN, D. E.; MCMULLEN, M. P.; DRAPER, M. A.; MADDEN, L. V. Efficacy of triazole-based fungicides for fusarium head blight and deoxynivalenol control in wheat: A multivariate meta-analysis. **Phytopathology**, v.98, p.999-1011, 2008.

PERNAK, J.; SOBASZKIEWICZ, K.; MIRSHA, I. Anti-microbial activities of ionic liquids, **Green Chemistry**, v.5, p. 52–56, 2003.

PERNAK, J., NIEMCZAC, M., MATENA, K. MARCINKOWSKA, K., PRACZYK, T. Ionic Liquid as herbicides and plant grow regulators, **Tetrahedron**, v.69, p. 4665-4669. 2013.

PETKOVIC, M.; FERGUSON, J.; BOHN, A.; TRINDADE, J.; MARTINS, I.; CARVALHO, M. B.; LEITAO, M. C.; RODRIGUES, C.; GARCIA, H.; FERREIRA, R.; K. R.; SEDDON, K. R.; REBELO, L.P.N.; SILVA, P. C. Exploring fungal activity in the presence of ionic liquids. **Green Chemistry** v.11, p.889–894, 2009.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.268-280, 2004.

PFEUFER, E. E.; NGUGI, H. K. Orchard factors associated with resistance and cross resistance to sterol demethylation inhibitor fungicides in populations of *Venturia inaequalis* from Pennsylvania. **Phytopathology**, v.102, p.272-282, 2012.

PHAM, T. P.; CHO, C. W.; YUN, Y. S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. **Water Research**, v.44, n..2, p.352-72, 2010.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C.; IGNACZAK, J. C.; AMBROSI, I. Impacto econômico do uso do fungicida propiconazole na cultura do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 362-368. 1996.

PILGERAM, A. L.; HENSON, J. M. Sexual crosses of the homothallic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. tritici based on use of an auxotroph obtained by transformation. **Experimental Mycology**. v.16, p.35-43. 1992.

PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. **Chemical Society Reviews**, v.37, p.123-150. 2008.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; BATTILANI, P.; PIVA, G. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1007-10014, 2009.

PRITSCH, C., MUEHLBAUER, G. J.; BUSHNELL, W. R.; SOMERS, D. A.; VANCE, C. P. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v.13, p.159–169, 2000.

PURI, K. D.; ZHONG, Z. The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat **Phytopathology**, v.100, p.1007-1014, 2010.

PUHALLA, J. E., 1981 **Genetic considerations of the genus *Fusarium***.pp. 291-305. In: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*, Edited by P. E. NELSON, T. A. TOUSSOLIN and R. J. COOK. Pennsylvania State University Press, University Park, Pa.

PUHALLA J .E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.179-183, 1985.

QI, W.; KWON, C.; TRAIL, F. Microarray analysis of transcript accumulation during perithecium development in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*) **Molecular Genetics and Genomics**, v.276 p. 87-100. 2006.

RADEMACHER W. Growth retardents: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Biology**, v.51, p.501-531. 2000.

RAMOS, D. P.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R.D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia**, v. 44, n. 1, p. 24-31, 2014.

RAS. **Regras para análise de sementes/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, p.399, 2009.

RAMIREZ, M. L.; REYNOSO, M. M.; FARNOCHI, M. C.; TORRES, A. M.; LESLIE, J. F.; CHULZE, S. N. Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. **Food Additives & Contaminants**, v.24, p.1115–1120, 2007.

REIS, E. M. **Doenças do Trigo III; fusariose da espiga de trigo**. 2a ed. São Paulo. 1988.

REIS, E. M.; BLUM, M. M. C.; CASA, R. T.; MEDEIROS, C. A. Grain losses caused by the infection of wheat heads by *Gibberella zeae* in southern Brazil, from 1984 to 1994. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.134-137, 1996.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO (34: Porto Alegre). **Indicações Técnicas da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo**, 2002.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. 2012. **Indicações técnicas para a cultura do trigo e triticale- safra 2013**, Londrina, 2012. 220p.

RESOLUÇÃO RDC 7. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**, constante do Anexo desta Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, página 72, de 26 de fevereiro de 2011.

RIBICHICH, K. F.; LOPEZ, S. E.; VEGETTI, A. C. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. **Plant Disease**, v. 84, p.794–802. 2000.

RIDUAN, S. N.; ZHANG, Y. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. **Chemical Society**, v.42, n. 23, p.9055-9070, 2013.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. **Bioassay analysis using R.J. Statist. Software**, v. 12, n..5, p.-22. 2005.

SAMPIETRO D.A., DÍAZ C.G., GONZALEZ V., VATTUONE M.A., PLOPER L.D., CATALAN C.A., WARD T.J. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p.359–364, 2011.

SARVER, B. J.; WARD, T. J.; GALE, L. RISTLER, H. C.; AOKI, T.; NICHOLSON, P.; CARTER, J. BROZ, K.; O'DONNELL, K. Novel fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. **Fungal Genetics and Biology**, v.4, n.8, p.1096-107, 2011.

SEONG, K. Y.; ZHAO, X.; XU, J. R.; GULDENER, U.; KISTLER, H. C. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p.389-399, 2008.

SCHOTHORST R. C., VAN EGMOND H. P. Report from SCOOP task 3.2.10 “collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states” Subtask: Trichothecenes. **Toxicology Letters**. v.153, p.133-143, 2004.

SHIN, J. H.; HAN, J. H.; LEE, J. K.; KIM, K. S. Characterization of the maize stalk rot pathogens *Fusarium subglutinans* and *F. temperatum* and the effect of fungicides on their mycelial growth and colony formation. **The Plant Pathology Journal**, v.30, p.397-406. 2014.

SMIGLAK, M.; METLEN, A.; ROGERS, R. D. The second evolution of ionic liquids: from solvents and separations to advanced materials--energetic examples from the ionic liquid cookbook. **Accounts of chemical research**, v.40, v.11, p.1182-92. 2007.

SMITH, T.K.; SEDDON, I.R. Synergism demonstrated between *Fusarium* mycotoxins. **Feedstuffs**, p.12-17. 1998.

SON, H.; KIM, M.-G.; MIN, K.; LIM, J. Y.; CHOI, G. J.; KIM, J.-C., CHAE, SUHN-KEE.; LEE, Y.-W. WetA is required for conidiogenesis and conidium maturation in the ascomycete Fungus *Fusarium graminearum*. **Eukaryotic Cell**, v.13, n.1, p. 87–98. 2014.

SPOLTI, P.; BARROS, N. C.; GOMES, L. B.; SANTOS, J.; DEL PONTE, E. M. Phenotypic and pathogenic traits of two species of the *Fusarium graminearum* complex possessing either 15-ADON or NIV genotype. **European Journal Plant Pathology**, v.133, p.621-629, 2012a.

SPOLTI, P.; JORGE, B. C.; DEL PONTE, E. M. Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. **Tropical Plant Pathology** v.37, n.6, p. 419-423, 2012b.

SPOLTI, P.; DEL PONTEI, E. M. Agressividade diferencial de espécies do complexo *Fusarium graminearum* em interação com o fungicida tebuconazol na redução do rendimento de trigo. **Ciência Rural**, n.43, p.1560-1575, 2013.

SCHREKKER, H. S.; SILVA, D. O.; GELESKY, M. A.; STRACKE, M. P.; SCHREKKER, C. M. L.; GONÇALVES, R. S.; DUPONT, J. Preparation, cation-anion interactions and physicochemical properties of ether-functionalized imidazolium ionic liquids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, p.426-433. 2008.

SCHREKKER, S. H.; DONATO, R. K.; FUENTEFRIA, A. M.; BERGAMO, V.; OLIVEIRA, L. F.; MACHADO, M. M. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. **Medicinal Chemistry Communications**, v.4, p.1457-1460, 2013.

SOBROVA, P., ADAM, V., VASATKOVA, A., BEKLOVA, M., ZEMAN, L., KIZEK, R. Deoxynivalenol and its toxicity. **Inter-disciplinary Toxicology**, v.3, p.94–99, 2010

STACK, R. W.; MCMULLEN, M. P. **A visual scale to estimate severity of Fusarium Head Blight in wheat**. Fargo: NDSU Extension Service, 1995.1 folder. (NDSU. PP-1095).

STELLA, R. C.; RAJAM, S.; VENKATRAMAN, B. R. Characterization and antimicrobial evaluation of newly synthesized derivatives. **International Journal of Chem Tech Research**. v.4, n.4, p.1447-1450, 2012.

STARKEY, D. E.; WARD, T. J.; AOKI, T.; GALE, L. R.; KISTLER, H. C.; GEISER, D. M.; SUGA, H.; TÓTH, B.; VARGA, J.; O'DONNELL, K. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. **Fungal Genetics and Biology**, v.44, p.1191-1204, 2007.

SUMMERELL, B. A.; LAURENCE, M.H.; LIEW, E, C. Y.; LESLIE, J. F. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review. *Fungal Diversity*, v.4, n.1, p. 3–13, 2010.

SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.4, p.195-209. 1982.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.31, p.21-31, 2000.

TELLES, N.; FRANCISCO, X. B.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Viabilidade de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo durante o armazenamento. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 414-415, 2007.

TRAIL, F.; COMMON, R. Perithecial development by *Gibberella zeae*: a light microscopy study. **Mycologia**. v.92, p.130-138, 2000.

TRAIL, F.; XU, H.; LORANGER, R.; GADOURY, D. Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Mycologia**, v.94, p.181–189. 2002.

TRAIL, F. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. **Plant Physiology**, v.149, p.103–110, 2009.

WARD, T. J.; BIELAWSKI, J. P.; KISTLER, H. C.; SULLIVAN, E.; O'DONNELL, K. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, p.9278–9283, 2002.

WALKER, S. L. S.; LEATH, W. M.; HAGLER, J. R.; MURPHY, J.P. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina. **Plant Disease**. v.85, p.404-410. 2001.

WANG, J.; ZHOU, M. Monitoring and management of MBC resistance in *Gibberella zeae*. **Journal of Nanjing Agricultural University**. v.25, p.43-47, 2002.

WANG, J. H.; NDOYE, M.; ZHANG, J. B.; LI, H. P. Population Structure and Genetic Diversity of the *Fusarium graminearum* Species Complex; **Toxins** (Basel). v.3, n.8, p.1020–1037, 2011.

WANYOIKE, M. W.; KANG, Z.; BUCHENAUER, H. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during the infection of wheat heads. **European Journal of Plant Pathology**. v.108, p.803–810. 2002.

WELTON, T., Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. **Chemical Reviews**, v.99, p.2071, 1999.

WALDEN P. Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. **Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Petersbourg**. St. Petersburg, n.1800, p. 405–422,1914.

WHITE, P. M.; POTTER, T. L.; CULBREATH, A. K. “Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics,” **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 6, p. 1393–1402. 2010.

WU, F.; MUNKVOLD, G. P. Mycotoxins in ethanol co-products: modeling economic impacts on the livestock industry and management strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.3900-3911, 2008.

XU, Z.; KIM, S. K.; YOON, J. Revisit to imidazolium receptors for the recognition of anions: highlighted research during 2006–2009. **Chemical Society Reviews**, v.39, p.1457–1466, 2010.

YIN, Y.; LIU, X.; LI, B.; MA, Z. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. **Phytopathology**, v.99, p.487-497, 2009.

YLI-MATTILA, T.; GAGKAEVA, T.; WARD, T. J.; AOKI, T.; KISTLER, H.C.; O'DONNELL, K. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. **Mycologia**, v.101, p.841–852, 2009.

YOSHIDA, M.; NAKAJIMA, T. Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. **Phytopathology**, v.100, n.8, p.763-773, 2010.

YUEN, G. Y.; SCHONEWEIS, S. D. Strategies for managing fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.126–130, 2007.

YUN, S. H., ARIE, T.; KANEKO, I.; YODER, O. C.; TURGEON, B. G. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**. v.31, p. 7-20. 2000.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, S. V.; OLIVEIRA, S. H. F. **Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2007, 168p.

ZAMBOLIM, L. **Tipos de fungicidas empregados no controle de doenças de plantas**. pp. 263-348 In: Zambolim, L.; Picanço, M. C.; Silva, A. A.; Ferreira, L. A.; Ferreira, F. A.; Jesus Jr., W. C. (Eds). *Produtos Fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas)*. Viçosa, MG: UFV/ DFP, 2008. 652p.

ZHANG, C.; DING, Z.; SUHAIME, N. A M.; KNG, Y.; ZHANG, Y. G.; ZHUO, L. A class of synthetic imidazolium salts possesses anti-oxidative and anti-fibrotic properties in hepatic stellate cells. **Free Radical Research**, v.43, p. 899-912, 2009.

ZHAO L, ZHANG C, ZHUO L. Imidazolium salts: a mild reducing and antioxidative reagent. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, p.12586-12587, 2008.

ZHU, X.; ZHANG, D.; LIU, C. New insight into the formation mechanism of imidazolium-based halide salts. **Journal of Molecular Modeling**, v.17, n.8, p.2099-2102, 2011.

ZHENG, W.; ZHAO, X.; XIE, Q.; HUANG, Q.; ZHANG, C.; ZHAI, H.; XU, L.; LU, G.; SHIM, W. B.; WANG, Z. A conserved homeobox transcription factor Htf1 is required for phialide development and conidiogenesis in *Fusarium* Species. **PLoS One**, v.7, n.9, p.1-13, 2012.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J.M.; MOLTÒ, J.C.; MAGÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an estrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.1-18.2007

ZELLER, K.A.; ROBERT, L.; BOWDEN, R. J.; LESLIE, J. F. Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from quadrats in Kansas and North Dakota. **Phytopathology**, v.93, p.874-880, 2003.