

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

Intensidade de giberela em trigo e diversidade, ecologia e potencial toxigênico de populações do complexo de espécies *Fusarium graminearum*

Piérri Spolti  
Mestre em Fitotecnia-Fitopatologia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia/  
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Dezembro de 2013



Aos meus pais, Tânia e Cláudio Spolti, por terem adotado o amor e o exemplo como formas de educar! Meus maiores professores.  
*DEDICO*

## *AGRADECIMENTOS*

À minha família, meus pais Tânia e Claudir Spolti e à minha irmã Pâmela Spolti, por todo o apoio e amor.

Ao meu orientador de mestrado e de doutorado, amigo e professor, Emerson Medeiros Del Ponte, por toda a amizade e ensinamentos. A minha eterna gratidão.

Ao professor Gary Carlton Bergstrom, pelo suporte e todo o auxílio no período em Ithaca e pelo exemplo como profissional e pessoa.

Ao pesquisador José Maurício Cunha Fernandes, pela troca de ideias e sugestões na condução dos trabalhos.

Aos professores Valmir Duarte, Rafael Gomes Dionello e Dauri José Tesmann pelas sugestões na qualificação do doutorado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pelos ensinamentos e auxílio na realização do doutorado.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de epidemiologia da UFRGS, pela amizade e pelo excelente convívio.

Aos bolsistas de iniciação científica, pela paciência, auxílio e responsabilidade na condução dos experimentos.

Aos alunos e funcionários do laboratório do prof. Gary, pelo auxílio e suporte na condução dos experimentos em Cornell.

Aos meus amigos, Denis Salvatti Guerra e Cristina Wun Guerra, pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis. E à família Wun, por me proporcionar momentos felizes nos domingos solitários de Porto Alegre.

À minha namorada, Larissa Perin, pelo apoio, carinho e por entender os momentos de ausência.

Ao meu irmão por escolha, Paulo Roberto Kuhnem Júnior, pela amizade, pelas conversas e trocas de ideias que não ficaram restritas à fitopatologia!

À sociedade brasileira, representada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiar e viabilizar o meu doutorado.

INTENSIDADE DE GIBERELA EM TRIGO E DIVERSIDADE, ECOLOGIA E  
POTENCIAL TOXIGÊNICO DE POPULAÇÕES DO COMPLEXO DE  
ESPÉCIES *Fusarium graminearum*<sup>1</sup>

Autor: Piérri Spolti

Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte

**RESUMO**

A giberela é uma das principais doenças do trigo devido à contaminação dos grãos com micotoxinas produzidas pelo patógeno. A doença é causada principalmente por populações do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG), o qual é composto por várias espécies filogenéticas com estrutura biogeográfica. Num primeiro estudo, a incidência (*I*) e a severidade (*S*) de giberela foram quantificadas em 160 lavouras de trigo no Estado do Rio Grande do Sul. Um modelo log-log complementar foi ajustado para a relação *I-S* aos dados de todos os campos (coeficiente angular= 1,13; intercepto= -2,76). Análises de heterogeneidade baseadas no índice de dispersão, teste  $C(\alpha)$  e lei da potência binária, mostraram um predomínio (82%) do padrão aleatório da doença nas lavouras. Num segundo estudo, 455 isolados do patógeno, das mesmas lavouras, foram identificados por métodos moleculares quanto à espécie filogenética e ao potencial toxigênico. A genotipagem multilocus ou sequenciamento do gene *TEF1- $\alpha$*  mostrou que *F. graminearum* (Fgra) foi a espécie predominante em trigo (407/455), seguido por *F. meridionale* (Fmer, 25/455), *F. cortaderiae* (Fcor, 17/455), *F. austroamericanum* (Faus, 3/455) e *F. asiaticum* (Fasi, 3/455). Todos os isolados Fgra apresentaram genótipo tricoteceno 15-ADON, 24 isolados Fmer apresentaram genótipo NIV. Todos os isolados Fasi apresentaram genótipo NIV, enquanto isolados Fcor e Faus apresentaram tanto o genótipo NIV como 3-ADON. A identificação e análise de frequência de 189 isolados obtidos da resteva de milho (população saprofítica, n = 54), da atmosfera durante o florescimento do trigo no dossel da cultura (população aérea, n = 34) e de grãos giberelados (população patogênica, n = 101) em três áreas experimentais de trigo mostrou que a frequência das espécies diferiu nessas populações. Fgra predominou na população patogênica, e Fmer e Fcor na população saprofítica. Em estudo de competitividade das espécies, quando uma mistura de Fgra + Fmer foi inoculada em quatro cultivares de trigo, Fgra apresentou maior *fitness* patogênico que Fmer. Num terceiro estudo, cinquenta isolados de Fgra obtidos de trigo do estado americano de Nova York (NY), em 2011, incluindo 25 isolados 15-ADON e 25 isolados 3-ADON, foram caracterizados e comparados por 14 atributos do *fitness* saprofítico e patogênico. Os isolados dos dois genótipos não puderam ser discriminados para a maioria das características. Na população contemporânea de Fgra causando giberela em trigo em NY, isolados 3-ADON não apresentaram nenhuma vantagem detectável sobre isolados 15-ADON no *fitness* saprofítico ou patogênico.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (113p.) Dezembro, 2013.

# FUSARIUM HEAD BLIGHT INTENSITY ON WHEAT, DIVERSITY, ECOLOGY, AND TOXIGENIC POTENTIAL OF *Fusarium graminearum* SPECIES COMPLEX POPULATIONS<sup>1</sup>

Author: Piérri Spolti

Advisor: Emerson Medeiros Del Ponte

## ABSTRACT

Fusarium head blight is a major disease of wheat due to contamination of grain with mycotoxins produced by the pathogenic fungus. The disease is primarily caused by *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), which includes several phylogenetic species biogeographically structured. In a first study, the incidence (*I*) and severity (*S*) of FHB epidemics were quantified in 160 wheat fields in Rio Grande do Sul State. A complimentary log-log model was fit to *I-S* relationship data from all fields (slope= 1.13; intercept= -2.76). Heterogeneity analysis based on dispersion index,  $C(\alpha)$  test, and binary power law model, suggested a predominant (82%) random pattern of the disease in the fields. In a second study, 455 isolates of the pathogen were obtained from the surveyed fields and were molecularly identified to phylogenetic species and toxigenic potential. Multilocus genotyping assay or sequencing of TEF1- $\alpha$  gene showed that *F. graminearum* (Fgra) was the dominant species (407/455), followed by *F. meridionale* (Fmer, 25/455), *F. cortaderiae* (Fcor, 17/455), *F. austroamericanum* (Faus, 3/455), and *F. asiaticum* (Fasi, 3/455). All Fgra isolates were of the 15-ADON trichothecene genotype and 24 Fmer isolates were of the NIV genotype. All Fasi isolates were of the NIV, while Fcor and Faus were of either 3-ADON or the NIV genotype. The identification and frequency analysis of 189 isolates from corn stubble (saprophytic population, n=54), isolates collected during wheat flowering for the air above the canopy (airborne population, n = 34) and from *Fusarium*-damaged kernels (pathogenic population, n = 101) in three wheat fields showed differences in species frequency among these populations. Fgra was dominant in the pathogenic population while Fmer and Fcor were dominant in the saprophytic population. In a species competition assay, when a mixture of Fgra + Fmer inoculum was inoculated onto four wheat varieties, Fgra showed higher pathogenic fitness than Fmer. In a third study, fifty isolates of Fgra obtained from wheat spikes in New York State (NY), 2011 year, including 25 isolates each of the 15-ADON and 3-ADON genotype, were characterized and compared for 14 different attributes of saprophytic and pathogenic fitness. Isolates of the two genotypes could not be differentiated for most of these traits, thus suggesting that 3-ADON isolates did not possess any detectable advantage over 15-ADON isolates of the contemporary population of Fgra from NY.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (113p.) December, 2013.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Importância da doença.....	4
2.2 Etiologia.....	8
2.3 Ciclo da doença e sintomas.....	10
2.4 Biologia de populações do patógeno.....	16
2.5 Distribuição e ecologia das espécies do complexo <i>Fusarium graminearum</i> .....	20
2.6 Epidemiologia e aerobiologia.....	23
2.6.1 Fontes de inóculo e sobrevivência.....	23
2.6.2 Disseminação do inóculo.....	25
2.6.3 Deposição do inóculo e sítios de infecção.....	27
2.6.4 Papel dos tricotecenos na patogenicidade e fatores relacionados à sua produção.....	29
2.6.5 Quantificação das epidemias e relação incidência- severidade.....	32
2.6.6 Distribuição espacial da doença.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Estudo 1 - Análise espacial e da relação incidência- severidade de giberela.....	36
3.1.1 Área de estudo, amostragem e dados coletados.....	36
3.1.2 Análise espacial de epidemias.....	37
3.1.2.1 Análise de heterogeneidade.....	37
3.1.2.2 Lei da potência binária.....	37
3.1.3 Relação incidência-severidade.....	38
3.1.3.1 Modelagem da relação incidência ( <i>I</i> ) e severidade ( <i>S</i> ).....	38
3.1.3.2 Precisão na estimativa da severidade a partir da incidência.....	39
3.1.3.3 Efeito da amostragem e do padrão espacial na estimativa da severidade.....	40
3.2 Estudo 2 - Biologia e ecologia do patógeno: espécies e potencial toxigênico.....	41
3.2.1 Levantamento de isolados do patógeno em populações regionais.....	41

	Página
3.2.2 Caracterização de populações locais: saprofítica, aérea e patogênica.....	41
3.2.2.1 Características das áreas de estudo.....	41
3.2.2.2 Quantificação de epidemias e micotoxinas....	41
3.2.3 Populações amostradas nas áreas.....	43
3.2.4 Procedimentos de isolamento e purificação.....	43
3.2.5 Extração de DNA.....	45
3.2.6 Identificação molecular das espécies e do genótipo tricoteceno.....	45
3.2.7 Teste de competitividade entre espécies.....	46
3.2.8 Análise dos dados.....	48
3.3 Estudo 3 - Caracterização de <i>fitness</i> de isolados norte-americanos com distinto potencial toxigênico.....	49
3.3.1 Isolados do fungo.....	49
3.3.2 Crescimento micelial e sensibilidade à temperatura....	49
3.3.3 Formação de peritécios e ascósporos em meio de cenoura.....	50
3.3.4 Formação de peritécios e ascósporos em colmos de milho.....	51
3.3.5 Agressividade em cultivar de trigo suscetível à giberela.....	53
3.3.6 Análise dos dados.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Estudo 1 - Análise espacial e da relação incidência-severidade de giberela.....	55
4.1.1 Resultados.....	55
4.1.1.1 Intensidade das epidemias.....	55
4.1.1.2 Análise de heterogeneidade.....	57
a) Índice de dispersão ( $D$ ) e teste $C(\alpha)$ .....	57
b) Lei da potência binária.....	58
4.1.1.3 Relação incidência ( $I$ ) – severidade ( $S$ ).....	59
a) Modelagem da relação $I$ - $S$ .....	59
b) Precisão na estimativa da severidade a partir da incidência.....	61
c) Efeito da amostragem e do padrão espacial na estimativa da severidade.....	62
4.1.2 Discussão.....	62
4.2 Estudo 2 - Biologia e ecologia do patógeno: espécies e potencial toxigênico.....	68
4.2.1 Resultados.....	68
4.2.1.1 Caracterização da população regional.....	68
4.2.1.2 Caracterização de populações locais: saprofítica, aérea e patogênica.....	71
4.2.1.3 Ensaio de competitividade entre espécies.....	75
4.2.2 Discussão.....	77
4.3 Estudo 3 - Caracterização de <i>fitness</i> de isolados norte-americanos com distinto potencial toxigênico.....	82
4.3.1 Resultados.....	82



	Página
4.3.1.1 Caracterização saprofítica.....	82
4.3.1.2 Agressividade e produção de tricotecenos.....	84
4.3.1.3 <i>Fitness</i> geral dos genótipos tricotecenos.....	87
4.3.2 Discussão.....	89
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Limites máximos toleráveis de deoxinivalenol (DON) em trigo e derivados de acordo com a legislação vigente em cada país ou bloco econômico (União Européia).....	7
2. Intensidade de giberela em diferentes estádios fenológicos de cultivo do trigo em lavouras conduzidas sobre resteva de milho e sojam no norte do Rio Grande do Sul, safras 2009, 2010 e 2011.....	56
3. Sumário das análises de regressão da relação entre $CLL(I)^a$ e $CLL(S)^b$ de giberela para nove conjunto de dados de acordo com a safra, estágio fenológico no momento da amostragem, cultura da resteva presente na lavoura e todos os dados.....	60
4. Teste de verossimilhança dos fatores de covariância no ajuste do modelo complementar log-log na relação dos valores transformados de incidência ( $I$ ) e severidade ( $S$ ) de giberela em lavouras de trigo na porção norte do estado do Rio Grande do Sul, safras de 2009 a 2011.....	61
5. Número de isolados por área e por população dentro de cada área, intensidade de giberela e concentração de micotoxinas da classe dos tricotecenos nos grãos colhidos, safra 2011.....	72
6. Número de isolados para cada espécie filogenética do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> (CEFG) em três populações amostradas em três áreas experimentais de trigo - Santa Bárbara do Sul, Marau e Vacaria, Rio Grande do Sul safra 2011.....	73
7. Caracteres relacionados ao <i>fitness</i> saprofítico de 50 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> causando giberela em trigo no estado de Nova York na safra 2011, possuindo genótipo tricoteceno 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON) ou 15-ADON.....	83
8. Caracterização patogênica de 50 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> causando giberela em trigo no estado de Nova York em 2011, possuindo genótipo tricoteceno 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON) ou 15-ADON.....	84

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Filogenia de espécies de <i>Fusarium</i> produtoras de tricotecenos e estruturação das espécies filogenéticas do complexo <i>Fusarium graminearum</i> ( <i>Fusarium graminearum</i> species complex).....	10
2. Peritécios de <i>Fusarium graminearum</i> em colmos de milho inoculados e mantidos em ambiente controlado com condições ótimas de umidade e temperatura (A), peritécios em colmos de milho em condições naturais (B) e lavoura de trigo semeada sob alta densidade de resteva de milho em decomposição (C).....	13
3. Quadro sintomatológico da giberela em trigo causada por <i>Fusarium graminearum</i> . Os sintomas iniciais surgem na forma de lesões necróticas nas glumas (A) seguido da expansão dessas lesões para as espiguetas adjacentes com o retorcimento das aristas (B), podendo ocasionar a senescência prematura de toda a espiga (C). Em condições de alta umidade o fungo produz uma massa de esporos assexuais (macroconídios) em uma mucilagem alaranjada (esporodóquios) (D). Grãos de espigas gibereladas se apresentam com tamanho reduzido, deformados, chochos, eventualmente com micélio rosa do patógeno ou com apenas uma leve descoloração anormal (E).....	15
4. Localização geográfica das lavouras comerciais de trigo amostradas para giberela e coleção de isolados do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> (CEFG) no Rio Grande do Sul durante três anos.....	36
5. Localização das três áreas experimentais no Rio Grande do Sul onde três populações do patógeno foram obtidas da resteva, da atmosfera e de grãos de trigo giberelados, em 2011. Santa Bárbara do Sul (SBA); Marau (MAR) e Vacaria (VAC).....	42

	Página
6. Número de isolados de <i>Fusarium graminearum</i> dos genótipos 3-acetil(A)deoxivalenol(DON) e 15-ADON usados neste estudo originários de nove lavouras amostradas no oeste do estado de Nova York em 2011.....	50
7. Distribuição dos valores de incidência (A, B, C) e severidade (D, E, F) de giberela nas safras 2009 a 2011 (A, D), nos estádios fenológicos (sensu Zadoks <i>et al.</i> , 1974) (B, E), e em lavouras com resteva de milho ou soja (C, F). A linha dentro das caixas representa a mediana e as linhas superiores e inferiores das caixas representam os <i>quartis</i> de 75% e 25% dos dados, respectivamente. As barras verticais além das caixas representam os <i>quartis</i> de 10% e 90% dos dados, e os círculos indicam os valores discrepantes.....	56
8. Localização de 160 lavouras comerciais de trigo (círculos) da porção norte do estado do Rio Grande do Sul visitadas entre os anos de 2009 e 2011 e padrão espacial da incidência de giberela dentro das lavouras. Padrão espacial da incidência de giberela (aleatório ou agregado) com base no índice de dispersão ( <i>D</i> ). Quando o $D > 1$ ( $P < 0,05$ ), infere-se a agregação da doença.....	57
9. Distribuição da frequência do índice de dispersão ( <i>D</i> ) e relação entre <i>D</i> e a incidência de giberela ( <i>I</i> ) determinada em 20 pontos de amostragem por lavoura (A) e da relação <i>I-D</i> (B). Quando o $D > 1$ ( $P < 0,05$ ), infere-se a agregação da doença.....	58
10. Relação entre o logaritmo da variância binária ( $V_{bin}$ ) e o logaritmo da variância observada ( $V_{obs}$ ) da incidência de giberela em 160 lavouras comerciais de trigo amostradas no Rio Grande do Sul entre as safras 2009 a 2011. A linha contínua representa o ajuste dos dados à equação $\log(V_{obs}) = \log(a) + b \log(V_{bin})$ e a linha pontilhada ao modelo teórico em que $V_{obs} = V_{bin}$ com <i>a</i> e <i>b</i> igual a 1.....	59
11. Relação entre a incidência ( <i>I</i> ) e a severidade ( <i>S</i> ) de giberela pela transformação complemento log-log (A) e com dados não-transformados (B). Cada ponto representa médias de <i>I</i> e <i>S</i> de giberela em 200 espigas de cada lavoura de trigo, de um total de 160 lavouras, amostradas aleatoriamente no estado do Rio Grande do Sul, 2009 a 2011. As linhas sólidas nos dois gráficos representam a severidade predita pela transformação complementar log-log (A) e pela transformação inversa da severidade predita (B). Linhas pontilhadas representam o limites superior e inferior do IC95% da predição.....	61

	Página
12. Amplitude dos intervalos de 95% de predição da severidade (IC95% severidade) a partir da incidência de giberela ( <i>I</i> ) para valores de incremento no índice de dispersão ( <i>D</i> ), nas unidades amostrais (N) (B) e para a combinação de <i>D</i> e N (C). Resultados baseados na regressão considerando o conjunto total de 160 lavouras (Tabela 3), com número (n) constante de 10 espigas por unidade amostral.....	62
13. Número e localização geográfica de cinco espécies do complexo <i>Fusarium graminearum</i> (Fasi = <i>F. asiaticum</i> , Faus = <i>F. austroamericanum</i> , Fcor = <i>F. cortaderiae</i> , Fgra = <i>F. graminearum</i> e Fmer = <i>F. meridionale</i> ) e seus respectivos genótipos tricotecenos [3-acetil(A)deoxinivalenol(DON), 15-ADON e nivalenol (NIV)] numa população regional de 455 isolados obtidos de espigas sintomáticas de trigo de lavouras no Rio Grande do Sul em três safras consecutivas (2009 a 2011).....	69
14. Gráficos de mosaico da frequência relativa de 455 isolados do complexo <i>Fusarium graminearum</i> com três genótipos tricotecenos [NIV=nivalenol, 3A= 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON), 15A= 15-ADON] agrupados por duas classes de altitude dos campos (m), cultura de resteva, duas classes de incidência de giberela e três estádios fenológicos da cultura no momento da amostragem.....	70
15. Gráficos de mosaico para a proporção dos genótipos tricotecenos 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON), 15-ADON e nivalenol (NIV). A) proporção dos genótipos nas populações das três áreas experimentais: população saprofítica a partir de colmos de milho coletados em torno de 30 dias antes do florescimento do trigo, população atmosférica pela coleta de esporos viáveis com uso de meio semi-seletivo durante a floração do trigo e população patogênica a partir de grãos giberelados. B) proporção dos genótipos nas três áreas experimentais: MAR = Marau; SBA = Santa Bárbara do Sul e VAC = Vacaria, indiferente às populações de cada área.....	74
16. Biplots da análise de correspondência (A) entre as três áreas experimentais e a frequência dos genótipos em cada população e (B) entre a frequência de espécies do complexo <i>Fusarium graminearum</i> em cada população das três áreas amostradas. Populações saprofíticas (Sap), atmosférica (Atm) e patogênica (Pat). Isolados com genótipos 15-ADON (15A) ou a combinação de isolados nivalenol e 3-ADON (N+3A). Espécies do complexo: <i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto (Fgra), <i>Fusarium meridionale</i> (Fmer) e <i>Fusarium cortaderiae</i> (Fcor).....	75

	Página
17. Proporção de isolados recuperados de <i>Fusarium graminearum</i> (Fgra) e <i>Fusarium meridionale</i> (Fmer) identificados por incompatibilidade vegetativa (zona de barragem) originários de plantas de trigo inoculadas na antese com uma mistura igual (1:1) de ambas as espécies em três cultivares de trigo com reações distintas à giberela: Frontana (resistente), BRS Guamirim (moderadamente resistente) e BRS 194 (suscetível). A significância do desvio em relação à distribuição esperada 1:1 foi testada pelo teste exato de Fisher ( $P = 0,028$ ).....	76
18. Capacidade de formação de peritécios por isolados de <i>Fusarium graminearum</i> (n = 50) possuindo genótipo tricoteceno 3-ADON ou 15-ADON. Classificação da capacidade de formar peritécios estimada por notas, onde: - = não formou peritécio, +, ++ e +++ igual a 1% - 10%; 11% - 30% e > 30% da área coberta com peritécios, respectivamente. Avaliações em meio de cenoura após três ou seis dias à retirada do micélio das placas ou em colmos de milho 21 dias após à inoculação. Dados de um experimento que representam o resultado dos dois experimentos conduzidos.....	83
19. Distribuição dos valores de severidade de giberela (A) e da concentração de deoxinivalenol (B) para um conjunto de 25 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> de cada genótipo tricoteceno (15-ADON e 3-ADON) inoculados pelo método de inoculação da espiguetta central em plantas da cultivar de trigo Norm. A linha dentro das caixas respresenta a mediana, enquanto que as linhas superiores e inferiores das caixas representam os <i>quartis</i> de 75% e 25% dos dados, respectivamente. As barras verticais além das caixas representam os <i>quartis</i> de 10% e 90% dos dados, e os círculos fechados indicam os valores discrepantes.....	85
20. Variação na agressividade de seis isolados de <i>Fusarium graminearum</i> com os genótipos tricotecenos 15-ADON (A) e 3-ADON (B) inoculados em plantas de trigo da cultivar Norm.....	86
21. Concentração média de 15-acetil(A)deoxinivalenol(DON) e 3-ADON produzida por 25 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> com genótipo tricoteceno 15-ADON ou 3-ADON.....	87
22. Ordenação dos 50 isolados de <i>F. graminearum</i> . Os símbolos identificam os grupos encontrados pela análise de agrupamento. Primeiro componente Asc_milho, contagem de UFC em ágar-água liberados a partir de colmos de milho inoculados; segundo componente Tricot., somatório da concentração dos tricotecenos DON+15ADON+3ADON; terceiro componente Gib_acima, severidade de giberela acima do ponto de inoculação (espiguetta central) em plantas da cultivar de trigo Norm. Círculo: grupo 1; triângulo: grupo 2. Preto: isolados 15-ADON isolates; cinza: isolados 3-ADON.....	88

## 1 INTRODUÇÃO

A giberela do trigo, causada por populações do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG), é uma das principais doenças fúngicas da cultura que constitui um dos pilares da segurança alimentar, notoriamente no mundo Ocidental.

Uma doença tipicamente floral, a giberela pode reduzir a produtividade e a qualidade dos grãos pela produção de micotoxinas pelo patógeno, prejudiciais à saúde humana e animal. Com o objetivo de garantir a produção de alimentos seguros, vários países vêm adotando marcos legais para regulamentar os limites máximos toleráveis de micotoxinas em grãos e subprodutos de cereais, inclusive o Brasil. Para o trigo, a micotoxina de maior relevância pertence à classe dos tricotecenos, conhecida como deoxinivalenol (DON), onde se incluem também as formas acetiladas de DON, como 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON) e 15-ADON.

No Brasil, assim como em diversas regiões do mundo, epidemias de giberela no trigo se tornaram mais frequentes e severas nos últimos anos. No sul do país, entre os anos de 2000 e 2010, estima-se em pelo menos 10% os danos médios ocasionados por epidemias de giberela em trigo.

Diversos estudos sobre a epidemiologia da giberela do trigo foram conduzidos no Brasil. Na grande maioria, os resultados foram baseados em dados obtidos em parcelas experimentais ou em um número reduzido de lavouras. Estudos

epidemiológicos e de biologia de populações em larga escala, tais como o monitoramento e quantificação de epidemias, e a caracterização das populações patogênicas em lavouras de uma determinada região produtora podem ser úteis para definir métodos de amostragem e avaliação, elaborar hipóteses da dinâmica populacional do patógeno, bem como identificar os fatores de risco tanto à ocorrência da doença como a contaminação com micotoxinas, sejam eles relacionados ao ambiente, patógeno e hospedeiro.

As populações de *F. graminearum* ao redor do mundo são estruturadas em espécies filogenéticas com variado potencial toxigênico. No Brasil, entre os anos de 2006 a 2007, foi relatada a ocorrência de duas espécies do complexo associadas com grãos giberelados de trigo, onde *F. graminearum*, com o potencial toxigênico determinado por métodos moleculares (genotipagem) como sendo 15-ADON, apresentou-se como a espécie dominante (> 90% dos isolados). O monitoramento e análise temporal e espacial das populações do patógeno podem fornecer subsídios importantes para estudos de avaliação do risco, uma vez que genótipos agressivos ou toxigênicos podem ser introduzidos e se estabelecerem causando alterações no perfil populacional. A estruturação das populações do CEEG pode ser resultado de fatores como ambiente, adaptação ecológica ou preferência por hospedeiro.

Alterações no perfil populacional de *F. graminearum* da América do Norte vêm sendo associadas a possíveis vantagens adaptativas dos isolados de populações emergentes, com genótipo tricoteceno de uma forma acetilada de DON, 3-ADON, em relação às populações precedentes, com genótipo 15-ADON. Essa hipótese tem encontrado suporte em estudos de caracterização do *fitness* patogênico dos isolados de *F. graminearum*, porém sem o conhecimento do *fitness* saprofítico destes



isolados, apesar da importância da fase saprofítica como fonte de inóculo para as epidemias.

Esta tese testa diversas hipóteses. Primeiro, que o padrão espacial de giberela e a relação incidência-severidade da doença no sul do Brasil são distintos do que se tem relatado em regiões de clima temperado, especialmente devido ao predomínio no Brasil de práticas conservacionistas que favorecem o acúmulo de inóculo na resteva, o qual contribui para a maior densidade de inóculo no ambiente atmosférico. Além disso, supõe-se que as condições de clima subtropical e sistema de cultivo favorecem à maior diversidade de espécies filogenéticas do complexo, mas que no entanto populações dominantes apresentam maior vantagem competitiva. Finalmente, que isolados norte-americanos de *F. graminearum* com genótipo tricoteceno 3-ADON apresentam vantagem no *fitness* saprofítico e patogênico em relação a isolados 15-ADON.

A presente tese é dividida em três estudos. O primeiro e o segundo foram baseados em dados obtidos em visitas a lavouras comerciais de trigo na porção norte do estado do Rio Grande do Sul, durante três safras consecutivas, cujos objetivos foram: i) quantificar a intensidade da doença; ii) determinar o padrão espacial da doença com base em análise de heterogeneidade, iii) caracterizar a relação incidência-severidade; iv) identificar as espécies filogenéticas associadas com a doença e os fatores que influenciam na forma como essas estão distribuídas e; v) avaliar a competitividade entre as duas espécies dominantes. Um terceiro estudo, conduzido durante o período sanduíche na *Cornell University*, Estados Unidos, objetivou comparar mais de uma dezena de atributos do *fitness* patogênico e saprofítico de isolados de *F. graminearum* com genótipo tricoteceno 15-ADON ou 3-ADON.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância da doença

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é o segundo cereal mais produzido no mundo. Em 2013, a produção mundial foi estimada em 704,6 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por 1,34% desta produção, ou seja, aproximadamente 9,5 milhões de toneladas (FAO, 2013).

Dentre as principais doenças que incidem na cultura do trigo, a giberela, denominação comum da doença no Brasil, está entre as mais importantes atualmente, devido aos danos potenciais no rendimento e na qualidade da produção. A giberela ocorre tipicamente na fase de floração do trigo (Gilbert & Haber, 2013) e é causada principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum* (Schmale *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012; Boutigny *et al.*, 2013), e em menor frequência por outras espécies do gênero, tais como: *F. culmorum* (Scherm *et al.*, 2013), *F. pseudograminearum* (Obanor *et al.*, 2013), *F. avenaceum* (Logrieco *et al.*, 2002) e *F. poae* (Stenglein *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos, entre os anos de 1998 e 2000, as perdas por giberela em trigo foram estimadas em US\$ 2,7 bilhões (McMullen *et al.*, 2012). No Canadá, entre as safras de 1993 e 1998, as perdas também em trigo ocasionadas pela giberela foram estimadas em US\$ 500 milhões (Gilbert & Haber, 2013).

No Sul do Brasil, o dano médio em trigo causado por giberela sumarizado para 21 safras (de 1984 a 1994 e de 1999 a 2010) foi de 18,6% (Reis *et al.*, 1996; Panisson *et al.*, 2003; Casa *et al.*, 2004; Reis & Carmona, 2013), com incremento significativo entre o primeiro e o segundo período decadal; de 5,4% de danos, em média, entre 1984 e 1994, para 21,6%, em média, entre os anos de 2000 a 2010. Nessa última, os danos variaram de 11,2% (safra 2006) até 39,8% (safra 2007) (Reis & Carmona, 2013).

A maior frequência e intensidade das epidemias de giberela no Brasil, assim como a própria ressurgência da doença, podem estar relacionados a mudanças de práticas culturais, especialmente com a ampla adoção do plantio direto, que contribuiu para a manutenção do inóculo (Del Ponte *et al.*, 2005), bem como a variabilidade climática que pode ter favorecido a ocorrência de vários anos epidêmicos a partir da década de 1990 em algumas regiões produtoras da América do Sul e América do Norte (Del Ponte *et al.*, 2009; Kriss *et al.*, 2012a).

A redução no rendimento de grãos, o efeito negativo em atributos de qualidade do produto, juntamente com a presença de micotoxinas produzidas pelo fungo durante a infecção e colonização das espigas, têm elevado o status de giberela e do *F. graminearum* ao grupo das doenças de plantas e de patógenos mais importantes e estudados na atualidade. Consórcios e redes de pesquisa foram criados nas principais regiões produtoras de trigo do mundo, tendo por objetivo final minimizar as perdas ocasionadas pela giberela em trigo (Dean *et al.*, 2012; McMullen *et al.*, 2012; Gilbert & Haber, 2013).

Na América do Norte e na Europa, principalmente, a giberela em trigo vem crescendo em importância não somente pelos danos ocasionados com a redução do rendimento da cultura, mas principalmente pela contaminação dos grãos com

micotoxinas que têm implicações toxicológicas para a saúde de seres humanos e animais (Desjardins, 2006; Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011; McMullen *et al.*, 2012; Gilbert & Haber, 2013; Boutigny *et al.*, 2013).

Dentre as micotoxinas produzidas por *F. graminearum* se destacam aquelas do grupo dos tricotecenos B como deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) e as formas acetiladas de DON como 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON) e 15-ADON (Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011). Deoxinivalenol (DON) é a micotoxina de maior importância dentre os tricotecenos, com grande número de relatos de ocorrência em trigo e seus derivados, muitas vezes em concentrações elevadas.

Devido às dificuldades associadas ao manejo em pré-colheita em reduzir a concentração de micotoxinas nos grãos, muitos países promulgaram limites máximos toleráveis (LMT's) de concentração de micotoxinas em grãos e subprodutos (McMullen *et al.*, 2012; Gilbert & Haber, 2013), inclusive o Brasil (Anvisa, Resolução - RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011). Na Europa, o LMT de micotoxinas é regulado em trigo desde 2007 (CE N°1881/2006).

O LMT para a contaminação de trigo e derivados por DON varia entre os países (Tabela 1) e leva em consideração o grau de processamento do trigo e a utilização na alimentação. No Brasil, a micotoxina zearalenona (ZEA) também possui LMT's para trigo e derivados, sendo que a partir de janeiro de 2016 os LMT's para esta micotoxina em trigo serão de 100 a 200 µg/kg (Tabela 1).

A preocupação crescente com o problema e o monitoramento em escala global de micotoxinas em alimentos e rações têm mostrado que outros tricotecenos, que não apenas DON, podem ser detectados em níveis significantes, tal como nivalenol (Tanaka *et al.*, 1988; Thammawong *et al.*, 2010; Del Ponte *et al.*, 2012).

TABELA 1. Limites máximos toleráveis de deoxinivalenol (DON) em trigo e derivados de acordo com a legislação vigente em cada país ou bloco econômico (União Européia).

País/bloco	Tipo de produto <sup>a</sup>	DON - Limite máximo (µg/kg)
União Européia <sup>b</sup>	Trigo não processado	1.750
	Derivados do trigo	200-750
Rússia	Derivados do trigo	700
Estados Unidos	Trigo não processado	2.000
	Trigo processado	1.000
Canadá	Trigo não processado	2.000
	Trigo processado	1.000
China	Trigo processado	1.000
Japão <sup>c</sup>	Trigo	1.100
Índia <sup>c</sup>	Trigo	1.000
Brasil <sup>d</sup>	Trigo não processado	1.000
	Trigo processado	750

Fonte: *European Mycotoxins Awareness Network*, Anvisa, Scabusa. Disponível, respectivamente, em:

<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=79>

<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>

<http://www.scabusa.org>

<sup>a</sup> Trigo não processado inclui grãos, farinhas e derivados integrais.

<sup>b</sup> Há variação no limite máximo tolerável (LMT) entre países do bloco. Menores LMT's são definidos para derivados destinados à alimentação de recém-nascidos e crianças.

<sup>c</sup> Não há discriminação entre trigo e seus derivados.

<sup>d</sup> Valores que serão vigentes a partir de janeiro de 2016. A partir de janeiro de 2014 os limites máximos para trigo não processado e processado serão, respectivamente, 1.500 e 1.250 µg/kg.

Até o momento não há legislação prevendo LMT para NIV em alimentos ou rações (Leatherhead Food Research, 2010; Sugita-Konishi & Nakajima, 2010). Recentemente, a comissão da União Européia solicitou estudos junto à *European Food Safety Authority* (EFSA) uma opinião científica sobre o risco à saúde humana e animal relacionado à presença de NIV em alimentos e rações (EFSA, 2013). Baseado no limite máximo de consumo (LMC) de 0,7 µg de nivalenol/kg de peso corporal, no consumo diário de trigo e derivados por europeus e na concentração de NIV em 13.164 amostras de alimentos, rações e grãos não processados (trigo, cevada, milho, aveia) coletados entre 2001 e 2011 em 18 países europeus, a EFSA não observou risco à saúde humana associado à NIV.

No entanto, o consumo diário de trigo e derivados, o LMT e a concentração de NIV em cereais pode variar entre os locais amostrados. Del Ponte *et al.* (2012) analisaram amostras de 38 municípios do Rio Grande do Sul e observaram a co-contaminação de trigo com DON e NIV em 59 de 66 amostras com concentração média de DON e NIV igual a 540 e 337 µg/kg, respectivamente.

## 2.2 Etiologia

A giberela em trigo é causada principalmente pelo ascomiceto *Fusarium graminearum* (Astolfi *et al.*, 2012; McMullen *et al.*, 2012; Gilbert & Haber, 2013) cujo nome da fase sexuada é *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch. Ao longo do texto o nome do patógeno seguirá as recentes mudanças no código internacional de nomenclatura de algas, fungos e plantas, que sugere apenas o uso de um nome (*one fungus = one name*), sendo *Fusarium* o nome adotado pela comunidade científica (Geiser *et al.*, 2013).

Estudos no início da década de 2000 sugeriram a divisão da morfoespécie *F. graminearum* em sete linhagens estruturadas biogeograficamente (O'Donnel *et al.*, 2000). Posteriormente, tendo por base o reconhecimento de espécies filogenéticas, com concordância genealógica, os mesmos autores determinaram espécies e deram nomes à cada uma das linhagens originais ao então denominado complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) (O'Donnel *et al.*, 2004). Com base na sequência e análise de 12 genes informativos de isolados do fungo obtidos das mais diversas regiões geográficas do mundo, foram determinadas 15 espécies filogenéticas no complexo: *Fusarium acacia-mearnsii*, *F. aethiopicum*, *F. asiaticum*, *F. austroamericanum*, *F. boothii*, *F. brasilicum*, *F. cortaderiae*, *F. gerlachii*, *F. graminearum* sensu stricto, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, *F.*

*ussurianum*, *F. vorosii*, *F. nepalense* e *F. lousianense* (O'Donnell *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2009; Sarver *et al.*, 2011) (Figura 1).

Para a espécie mais comumente encontrada em todas as regiões do mundo, determinada anteriormente como linhagem 7, os autores optaram por manter o nome original acrescido do sufixo “sensu stricto” - *F. graminearum* sensu stricto (Fgra), que é de ocorrência cosmopolita e associada à giberela em cereais de inverno nas Américas e na Europa (Tóth *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2008; Reynoso *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2012; McMullen *et al.*, 2012), enquanto que *F. asiaticum* predomina como agente causal da giberela em algumas regiões da Ásia (Suga *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). Em cultivos de cereais (trigo-aveia-cevada-milho) no Cone-Sul (sul do Brasil, Uruguai e Argentina), além de Fgra, foram relatadas seis outras espécies do complexo: *F. meridionale* (Fmer) (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2012; Sampietro *et al.*, 2012), *F. boothii* (Fboo) (Sampietro *et al.*, 2012); *F. asiaticum* (Fasi) (Del Ponte *et al.*, 2013; Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013), *F. brasiliicum* (Fbra) (O'Donnell *et al.*, 2004; Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013), *F. cortaderiae* (Fcor) (Silva *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2013; Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013) e *F. austroamericanum* (Faus) (O'Donnell *et al.*, 2004; Del Ponte *et al.*, 2013; Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013).

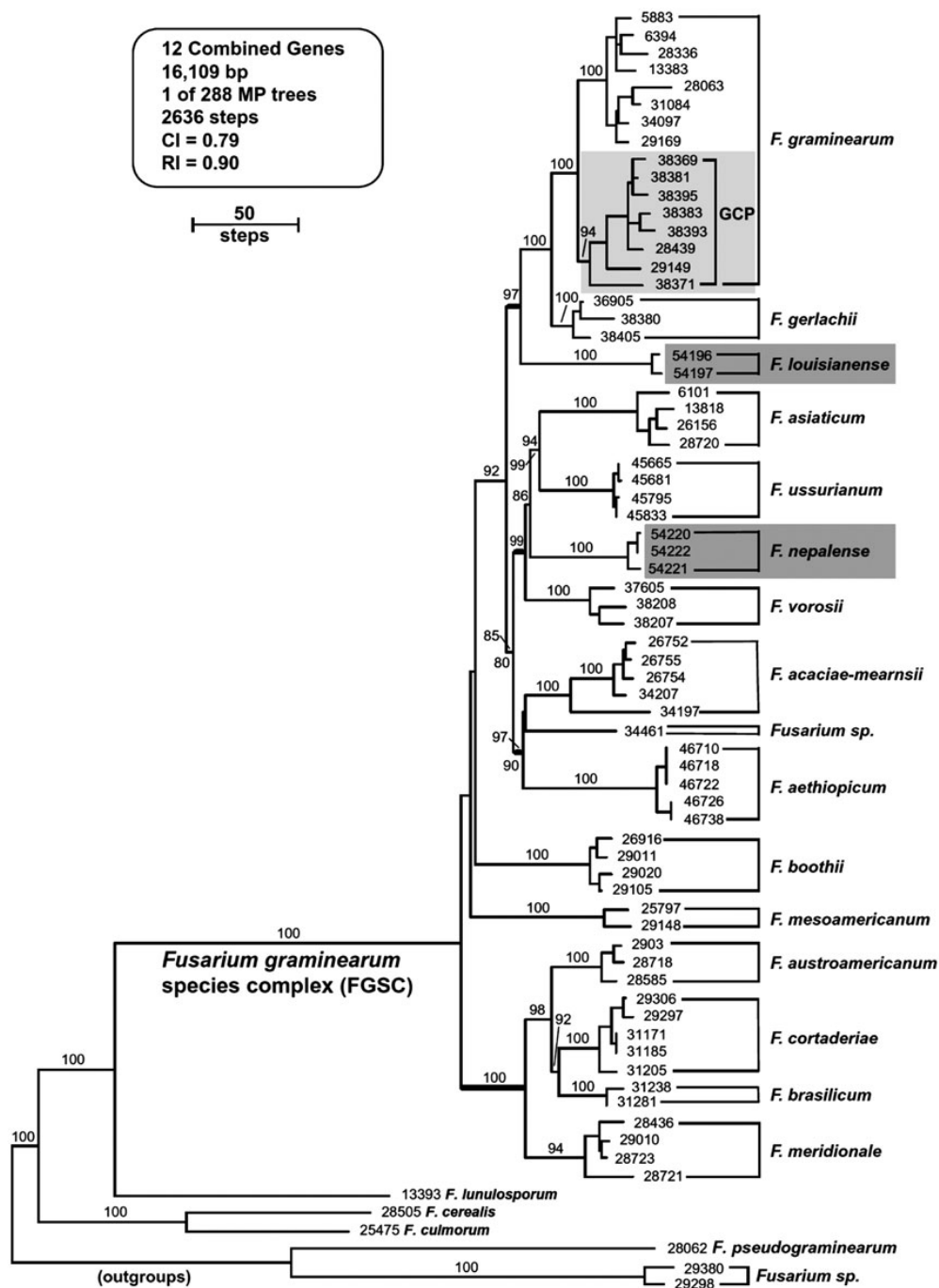


FIGURA 1. Filogenia de espécies de *Fusarium* produtoras de tricotecenos e estruturação das espécies filogenéticas do complexo *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum* species complex). Fonte: Sarver *et al.*, 2011).

### 2.3 Ciclo da doença e sintomas

A giberela é considerada uma doença de comportamento monocíclico devido ao curto período suscetível da doença (Sutton, 1982). Quando causada por



*F. graminearum*, o inóculo para as epidemias pode sobreviver, entre as estações de cultivo, nas sementes, como saprófita em resíduos vegetais na superfície do solo na forma de micélio latente ou pela formação de clamidósporos no solo (Reis, 1990a; Leplat *et al.*, 2013). O fungo possui uma ampla gama de hospedeiros alternativos que podem contribuir para a manutenção do inóculo para as epidemias (Landschoot *et al.*, 2011).

*Fusarium graminearum* pode sobreviver em resíduos de culturas como trigo, milho, cevada e centeio (Reis, 1988; Fernandez, 1991; Pereyra & Dill-Macky 2004) e em várias outras gramíneas, incluindo espécies dos gêneros *Agropyron*, *Agrostis*, *Andropogon*, *Botriochloa*, *Bromus*, *Cenchrus*, *Cortaderia*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Lolium*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Poa* e *Setaria* (Reis, 1988; Fernandez, 1991; Pereyra & Dill-Macky, 2008). Resíduos de plantas que não são gramíneas também têm sido relatados como hospedeiros de *F. graminearum* em condições naturais como soja, girassol e alfafa (Pereyra & Dill-Macky, 2008).

Nos resíduos de plantas hospedeiras *F. graminearum* produz estruturas de sobrevivência denominados peritécios (Figura 2), dentro dos quais os ascósporos (esporos sexuais) são formados (Dufault *et al.*, 2006; Leplat *et al.*, 2013). Os peritécios são formados sobre os resíduos de seus hospedeiros em temperaturas de 5 a 35°C, com temperatura ótima de 29°C (Sutton, 1982). A produção de ascósporos pode ocorrer em ampla faixa de temperatura (13 a 33°C), com temperatura ótima entre 25 a 28°C. No campo, a maturação dos peritécios ocorre após um período de duas a três semanas (Sutton, 1982).

A taxa de liberação de ascósporos é maior na presença de luz do que no escuro (Trail *et al.*, 2002). No entanto, a maior deposição dos ascósporos ocorre

durante a noite (>90%) (Del Ponte *et al.*, 2005, Prussin, 2013) como resultado da inversão da turbulência atmosférica no período noturno.

Os ascósporos de *F. graminearum* são ejetados dos peritécios em velocidades de até 34,5 m/s (124 km/h) numa altura média de 4 a 5 mm (Trail *et al.*, 2005), carregados pela turbulência acima do dossel da cultura (Paul *et al.*, 2004), e então carregados pela turbulência atmosférica a longas distâncias da fonte de origem (Maldonado-Ramirez *et al.*, 2005; Schmale *et al.*, 2012).

O período de suscetibilidade do trigo às infecções por *F. graminearum* se estende do início da floração até estádios de grão em massa em cultivar suscetível (Del Ponte *et al.*, 2007), sendo que o período entre o início e 10 dias após florescimento é considerado crítico para o manejo da giberela em trigo (Cowger *et al.*, 2009; Spolti *et al.*, 2013a).

Os esporos assexuais (macroconídios) podem ser produzidos nos restos culturais ou nas espigas infectadas (Leplat *et al.*, 2013), de onde são liberados e dispersos ao ambiente principalmente pelo impacto da chuva.

Tanto os ascósporos como os macroconídios, em contato com as espigas, infectam os tecidos em condições de alta umidade relativa do ar (>80%) e temperatura entre 20 e 30°C (Del Ponte *et al.*, 2004) sendo a temperatura ótima entre 28 e 29°C (Rossi *et al.*, 2001). Infecções por *F. graminearum* não ocorreram em temperaturas menores que 10°C e maiores que 35°C (Rossi *et al.*, 2001). Variáveis climáticas baseadas na umidade relativa do ar, precipitação e a temperatura do ar em períodos ao redor do florescimento da cultura são comumente usadas em modelos preditivos de ocorrência da giberela em trigo (Del Ponte *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2013).

A floração plena (50% das anteras extrusadas) é considerada a fase de maior suscetibilidade da cultura, tanto que é o momento mais indicado para o controle da doença com fungicidas, embora infecções mais tardias, nas fases de enchimento de grãos, também possam ocorrer (Parry *et al.*, 1995; Del Ponte *et al.*, 2007; Cowger & Arrellano, 2010; Spolti *et al.*, 2013a; Siou *et al.*, 2013).



FIGURA 2. Peritécios de *Fusarium graminearum* em colmos de milho inoculados e mantidos em ambiente controlado com condições ótimas de umidade e temperatura (A), peritécios em colmos de milho em condições naturais (B) e lavoura de trigo semeada sob alta densidade de resteva de milho em decomposição (C). Figura 1B é cortesia de P. R. Kuhnem Jr.

Condições ambientais nos períodos anteriores e posteriores ao início do florescimento têm maior influência na produção/liberação do inóculo (Paul *et al.*, 2007) e à infecção/colonização (Del Ponte *et al.*, 2007), respectivamente.

Após a infecção, o fungo coloniza o ráquis, podendo os sintomas serem observados após 4-6 dias na forma de áreas necrosadas e senescência prematura de

espiguetas infectadas. A partir do sítio de infecção, os sintomas podem progredir para toda a espiga, sendo a taxa de colonização dependente do nível de resistência da cultivar e da temperatura (Parry *et al.*, 1995) (Figura 3).

Nas primeiras horas após o início da infecção, ainda sem sintomas visíveis, ocorre o crescimento das hifas de *F. graminearum* que colonizam os espaços extracelulares. Estudos moleculares mostraram, nessa fase, uma alta expressão dos genes *Tri* (*Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri9*, e *Tri14*), relacionados à síntese das micotoxinas da classe dos tricotecenos, sendo essa expressão reduzida drasticamente após a morte da célula do hospedeiro (Brown *et al.*, 2010, Brown *et al.*, 2011). No entanto, a transcrição do gene *Tri5* foi verificada em até 21 dias após o início da infecção (Hallen-Adams *et al.*, 2011). As micotoxinas produzidas por *F. graminearum* inibem a síntese proteica suprimindo a defesa da planta (Jansen *et al.*, 2005). Apenas após a penetração da hifa na célula vegetal, ocorre o extravasamento celular de proteínas e de açúcares, dando início à resposta de defesa do hospedeiro (Brown *et al.*, 2010, Brown *et al.*, 2011).

Cerca de 10 dias após o estabelecimento da infecção, o conteúdo das células fúngicas localizadas no tecido corticoso morto é realocado para as hifas logo abaixo da epiderme da ráquis quando então, sob condições de umidade contínua e prolongada, tem início a conidiogênese (Dean *et al.*, 2012).

Há uma tendência dos sintomas progredirem na direção basipetal em detrimento ao movimento acropetal (Malbrán *et al.*, 2012; Malbrán *et al.*, 2013) podendo ocorrer a senescência das espiguetas sem a presença do micélio, como sintoma da fitotoxidez pelas micotoxinas produzidas durante a infecção/colonização (Brown *et al.*, 2011).



FIGURA 3. Quadro sintomatológico da giberela em trigo causada por *Fusarium graminearum*. Os sintomas iniciais surgem na forma de lesões necróticas nas glumas (A) seguido da expansão dessas lesões para as espiguetas adjacentes com o retorcimento das aristas (B), podendo ocasionar a senescência prematura de toda a espiga (C). Em condições de alta umidade o fungo produz uma massa de esporos assexuais (macroconídios) em uma mucilagem alaranjada (esporodóquios) (D). Grãos de espigas gibereladas se apresentam com tamanho reduzido, deformados, chochos, eventualmente com micélio rosa do patógeno ou com apenas uma leve descoloração anormal (E).

Grãos infectados apresentam-se deformados e chochos (Figura 3E). Os danos no rendimento podem ser maiores quando a infecção ocorre no momento da floração, ocasionando grande redução no peso dos grãos, os quais podem ser mais facilmente descartados no momento da colheita pelos ajustes dos mecanismos da colhedora (Salgado *et al.*, 2011). Grãos giberelados descartados no momento da colheita podem servir de fonte inóculo (Inch & Gilbert, 2003), mas a importância dessa fonte para as epidemias não é bem conhecida.

Em determinadas situações, grãos giberelados podem apresentar peso semelhante ao de grãos saudáveis, o que poderia dificultar a sua eliminação do lote no

momento da colheita (Del Ponte *et al.*, 2007; Spolti *et al.*, 2013b; Siou *et al.*, 2013). Assim, grãos assintomáticos ou com danos mínimos (menor redução de peso ou apresentando apenas descoloração) também podem se apresentar contaminados com micotoxinas, possivelmente devido às infecções que ocorrem em condições marginais, na ocorrência de infecções tardias, ou ainda como consequência da transcrição tardia de genes relacionados à síntese de tricotecenos (Cowger & Arrellano, 2010; Hallen-Adams *et al.*, 2011; Siou *et al.*, 2013).

#### **2.4 Biologia de populações do patógeno**

Importantes avanços têm sido observados em estudos de ecologia, biologia e epidemiologia molecular de *F. graminearum* onde a diversidade genética tem sido avaliada com diversos marcadores moleculares (AFLP, VNTR, RAPDs) (Wang *et al.*, 2011). Em todos os estudos, foi observada uma alta diversidade genética em populações do CEFG (Gale *et al.*, 2002; Zeller *et al.*, 2003; Schmale *et al.*, 2006b; Burlakoti *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2011). De maneira similar, alto fluxo gênico foi detectado entre as populações dos membros do CEFG, sendo os isolados considerados membros de uma metapopulação (Gale *et al.*, 2002).

A alta interconectividade populacional, demonstrada pelos baixos valores do índice de fixação ( $G_{ST}$ ) na maioria das populações de Fgra e a alta recombinação gênica, sugere que a frequência de recombinação e do fluxo gênico entre populações, seja por mutações ou pela migração de outras regiões geográficas, pode facilitar a rápida incorporação de características genéticas relacionadas à agressividade em populações distintas (Zeller *et al.*, 2004).

A identificação e caracterização de populações regionais do CEFG pode gerar informações-chave para determinar estratégias de manejo da doença e a

avaliação de riscos com a contaminação com micotoxinas (Goswami & Kistler, 2004). No entanto, existe a necessidade de intensificar o monitoramento das populações e ampliar os estudos para considerar os aspectos epidemiológicos envolvidos com a diversidade do CEFG (Astolfi *et al.*, 2012).

A análise da diversidade genética e estrutura de populações do CEFG também revelou uma alta diversidade entre e dentro das espécies do complexo em relação ao potencial toxigênico das populações (Ward *et al.*, 2002; Astolfi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Malbrán *et al.*, 2013).

Isolados do CEFG podem produzir uma ampla gama de micotoxinas, sendo de maior relevância aquelas da classe dos tricotecenos B, como DON, nivalenol (NIV) e as formas acetiladas de DON (Puri & Zhong, 2010; Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011). Análises químicas de substratos artificiais ou de tecidos do hospedeiro são utilizadas para determinar o quimiotipo (fenótipo químico) específico de cada isolado do patógeno, que é definido pela micotoxina produzida e detectada em maior quantidade no substrato (Desjardins, 2006).

Grande atenção tem sido dada ao monitoramento temporal e espacial da distribuição dos genes relacionados à síntese dos tricotecenos nas populações do CEFG, como predição do quimiotipo dos isolados. Para tal, foram desenvolvidos diversos protocolos PCR com o uso de *primers* específicos com alvo em porções de genes preditivos da síntese dos tricotecenos (*Tri3*, *Tri5*, *Tri7*, *Tri12* e *Tri13*). Os protocolos existentes permitem identificar os genótipos NIV, DON e suas formas acetiladas: 3-ADON e 15-ADON (Ward *et al.*, 2002; Chandler *et al.*, 2003; Quarta *et al.*, 2006).

Apesar de algumas inconsistências entre os resultados de genotipagem e quimiotipagem (Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011; Sampietro *et al.*, 2012), o genótipo

tricoteceno vem sendo utilizado como informação preditiva do potencial toxigênico das populações do CEFG (Scoz *et al.*, 2009; Pasquali *et al.*, 2010; Reynoso *et al.*, 2011; Schmale *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2012). O conhecimento do perfil toxigênico das populações do CEFG é fundamental para o entendimento do risco de contaminação dos grãos com diferentes micotoxinas. Assim, levantamentos têm permitido mapear a ocorrência e distribuição desses três genótipos tricotecenos em populações do CEFG ao redor mundo (Starkey *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Astolfi *et al.*, 2011; Burkaloti *et al.*, 2011; Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011; Reynoso *et al.*, 2011; Schmale *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2013).

Ambos os genótipos DON e NIV têm sido encontrados em todas as regiões amostradas e, entre as duas formas acetiladas de DON, 15-ADON é o genótipo tricoteceno predominante na América do Norte (Ward *et al.*, 2008; Burlakotti *et al.*, 2011; Schmale *et al.*, 2011), América do Sul (Astolfi *et al.*, 2011; Reynoso *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2013) e Europa (Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2012), enquanto que NIV é o genótipo tricoteceno predominante na Ásia (Wang *et al.*, 2011).

Uma aparente mudança temporal e/ou espacial da população predominante 15-ADON para o genótipo 3-ADON tem sido sugerida em estudos que observaram um aumento da prevalência de isolados 3-ADON em populações contemporâneas, quando comparadas a populações mais antigas de Minnesota e do leste do Canadá (Ward *et al.*, 2008; Burlakotti *et al.*, 2011). Em algumas regiões da Ásia estudos de identificação do potencial toxigênico de isolados amostrados em vários anos sugeriram que populações de isolados NIV ou 15-ADON estariam sendo substituídas por uma população emergente de isolados 3-ADON (Wang *et al.*, 2011).



Diversos estudos objetivaram identificar os fatores que, potencialmente, poderiam levar a essa mudança do perfil populacional, tais como a agressividade dos isolados, e que poderia representar uma vantagem adaptativa para os isolados 3-ADON em comparação aos isolados 15-ADON (Eudes *et al.*, 2001; Gale *et al.*, 2009; Puri & Zhong, 2010; Von der Ohe *et al.*, 2010).

Alguns estudos mostraram que isolados 3-ADON foram capazes de 1) produzir maiores quantidades de DON na fase patogênica (Ward *et al.*, 2008; Puri & Zhong, 2010), 2) crescer mais rápido em meio de cultura artificial (Ward *et al.*, 2008) e 3) serem mais agressivos em plantas de trigo (Puri & Zhong, 2010; Von der Ohe *et al.*, 2010) do que isolados 15-ADON.

No entanto, não foi observada diferença na agressividade em plantas de trigo e cevada inoculadas com populações antecedentes (15-ADON) ou emergentes (3-ADON) de isolados da região do meio oeste dos Estados Unidos (Gale *et al.*, 2009). Da mesma forma, a severidade da doença, a proporção de grãos giberelados e a quantidade de DON produzida, como medidas de agressividade para dois grupos de genótipos, não discriminaram os isolados 3-ADON da população emergente de 15-ADON (isolados contemporâneos de 3-ADON) do leste canadense onde quatro isolados representaram cada população (Foroud *et al.*, 2012).

Todos esses estudos prévios enfocaram principalmente na caracterização da agressividade dos isolados como medida de *fitness* (Eudes *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2008; Gale *et al.*, 2009; Puri & Zhong, 2010; Von der Ohe *et al.*, 2010; Foroud *et al.*, 2012). Apesar da importância desempenhada pela fase saprofítica de *F. graminearum* na sobrevivência entre as estações e como fonte de inóculo para as epidemias de giberela (Sutton, 1982; Dill-Macky & Jones, 2000; Akinsanmi *et al.*,

2007; Tunali *et al.*, 2012; Leplat *et al.*, 2013), apenas dois estudos (Ward *et al.*, 2008; Puri & Zhong, 2010) investigaram diferenças na taxa de crescimento micelial, como uma medida do *fitness* saprofítico e mostraram resultados contraditórios. Ward *et al.* (2008) observaram que isolados 3-ADON apresentaram maior taxa de crescimento micelial do que isolados 15-ADON, mas essa diferença não foi observada em outro estudo com isolados da região norte dos Estados Unidos (Puri & Zhong, 2010).

### **2.5 Distribuição e ecologia das espécies do complexo *Fusarium graminearum***

A estruturação filogeográfica das populações de *F. graminearum* foi inicialmente sugerida por O'Donnell *et al.* (2000) expandida e alterada posteriormente, com uma amostragem global e com um número maior de isolados (O'Donnell *et al.*, 2004). Assim, foi sugerido que Fmer e Faca seriam espécies filogenéticas endêmicas na América do Sul e Austrália, respectivamente, enquanto que Fgra apresentou-se como uma espécie cosmopolita, com distribuição global afetando principalmente o trigo dentre outros cereais (Martinelli *et al.*, 2001; Gale *et al.*, 2002; Zeller *et al.*, 2004; Ramirez *et al.* 2007; Qu *et al.*, 2008; Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2011).

Na Ásia, Fasi é a espécie prevalente no Japão (Suga *et al.*, 2008) e na China (Qu *et al.*, 2008), com a co-ocorrência de Fgra ou mesmo a dominância de Fgra em algumas regiões (Qu *et al.*, 2008; Suga *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). Além de Fasi e Fgra também foram relatadas as espécies Fmer, Fboo e *F. nepalense* no continente asiático (Wang *et al.*, 2011).

Na Europa, a espécie Fgra é a mais prevalente, além de relatos de ocorrência de Fmer, Fcor e Fboo (Tóth *et al.*, 2005; Boutigny *et al.*, 2013; Somma *et al.*,

2013). Segundo Boutigny *et al.* (2013) a espécie Fboo teria sido recentemente introduzida na França a partir de sementes importadas, tendo destacada a importância que a identificação das espécies filogenéticas pode assumir no comércio internacional.

Também na América do Norte e na América do Sul a espécie Fgra é dominante nas populações patogênicas, com relatos de Fger, Fasi e Flou no sul dos Estados Unidos (Gale *et al.*, 2011; Sarver *et al.*, 2011; Schmale *et al.*, 2011), Fmer e Fboo na Argentina (Sampietro *et al.*, 2012) e Fasi, Fcor e Faus no Uruguai (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013).

No Brasil, uma grande diversidade de espécies filogenéticas do CEEFG foi relatada em estudos de identificação dos isolados associados com diversos hospedeiros de importância econômica. Além de Fgra, também foram identificadas as espécies Faus, Fmer, Fcor, Fasi associadas com as culturas do trigo, cevada, soja e milho (Martinelli *et al.*, 2001; Astolfi *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2013).

No Sul do Brasil Fgra e Fmer foram as espécies encontradas em maior frequência, ao redor de 90% e 10%, respectivamente, em isolamentos do patógeno feitos a partir de grãos sintomáticos de trigo de lavouras comerciais entre os anos de 2006 a 2007 (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2012).

No Brasil, todos os isolados Fgra e Fmer identificados até o momento apresentaram, de maneira consistente, o genótipo tricoteceno 15-ADON e NIV, respectivamente. No entanto, na América do Norte, Europa e Ásia, Fgra tem apresentado os genótipo 15-ADON, 3-ADON ou NIV em frequências variadas de acordo com a região geográfica (Schmale *et al.*, 2011; Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Boutigny *et al.*, 2013; Somma *et al.*, 2013). Já Fmer tem

se apresentado de maneira consistente com o genótipo NIV em diversas regiões do mundo (Boutigny *et al.*, 2011; Sarver *et al.*, 2011; Boutigny *et al.*, 2013).

No Brasil a contaminação simultânea por DON e NIV detectada em grãos de lavouras comerciais de trigo pode ser resultado, principalmente, do comportamento simpátrico das espécies do CEFG com distinto potencial toxigênico (Del Ponte *et al.*, 2012; Spolti *et al.*, 2013a). A modulação da frequência das espécies e dos genótipos tricotecenos presentes nas populações do CEFG tem sido associada a diversos fatores tais como: adaptabilidade ao agrossistema (Lee *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2012), efeito de práticas de manejo (Zhang *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012), diferenças no *fitness* (Spolti *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) e preferência por hospedeiro (Lee *et al.*, 2009; Boutigny *et al.*, 2011).

A preferência por hospedeiro foi sugerida nos estudos de Lee *et al.* (2009) e Boutigny *et al.* (2011). No entanto, os autores divergem quanto à origem da preferência. Lee *et al.* (2009), em estudos com populações de áreas de arroz e trigo na Coreia do Sul, sugerem que a adaptação de Fasi ao agrossistema de lavouras de arroz determina a prevalência dessa espécie na cultura, como resultado de adaptações ecológicas não diretamente relacionadas à patogenicidade. Já Boutigny *et al.* (2011), na África do Sul, observaram que cerca de 85% dos 560 isolados amostrados ao longo de dois anos em 23 campos de trigo ou cevada correspondiam a Fgra. Para a mesma região, de 100 isolados obtidos de colmos de milho em 19 campos amostrados, só foram observados isolados Fboo. Assim, Boutigny *et al.* (2011) concluíram que a diferença drástica na frequência das espécies entre os dois hospedeiros seria resultado de *fitness* patogênico distinto dessas espécies nesses hospedeiros.

No Brasil, dados de levantamento e identificação de espécies de CEFG em grãos de trigo e de miho, assim como estudos com a inoculação das espécies nestes dois hospedeiros, indicam uma possível preferência das espécies do CEFG por hospedeiro, relacionado ao *fitness* patogênico (Scoz *et al.*, 2009, Astolfi *et al.*, 2011; Spolti *et al.*, 2012; Kuhnem *et al.*, 2013; Del Ponte *et al.*, 2013).

Em trigo (Scoz *et al.*, 2009) e cevada (Astolfi *et al.*, 2011), a frequência de Fgra foi de 92% e 66%, respectivamente. No entanto, em grãos de milho, houve predomínio de Fmer (72%), seguido por Fcor (14%) e Fgra (14%) (Del Ponte *et al.*, 2013). O mesmo predomínio de Fmer em milho foi observado na região noroeste da Argentina (Sampietro *et al.*, 2012).

Em estudos com inoculações dessas duas espécies em espigas de trigo (Spolti *et al.*, 2012) e em plântulas de milho (Kuhnem *et al.*, 2013), foi observado que Fgra foi mais agressiva em trigo e que Fmer foi mais agressiva em milho.

No entanto, além da diferença na agressividade, de acordo com o hospedeiro, uma possível adaptação ecológica (Lee *et al.*, 2009) poderia estar relacionada à frequência das espécies do CEFG no Brasil, uma vez que a proporção Fgra/Fmer tem variado de acordo com o campo amostrado, com a co-ocorrência dessas espécies num mesmo campo (Astolfi *et al.*, 2012).

## **2.6 Epidemiologia e aerobiologia**

### **2.6.1 Fontes de inóculo e sobrevivência**

Restos de culturas em decomposição constituem a principal fonte de inóculo para epidemias de giberela (McMullen *et al.*, 2012; Gilbert & Haber, 2013). Assim, a sucessão milho-trigo tem sido considerada como a que mais contribui para o aumento da quantidade de inóculo na área e do risco de ocorrência da doença sob

condições favoráveis do ambiente (Dill-Macky & Jones 2000; Schaafsma *et al.*, 2005; Nita *et al.*, 2006). Diversos hospedeiros alternativos como outras gramíneas incluindo plantas daninhas, além de girassol e soja, também podem hospedar *F. graminearum* (Martinelli *et al.*, 2001; Pereyra & Dill-Macky, 2008). A soja em sistema de plantio direto em sucessão com o trigo pode constituir importante fonte de inóculo (Baird *et al.*, 1997).

Os restos culturais, especialmente de culturas com grande volume para decomposição, como o milho, podem servir como fonte de inóculo de longa duração, com relatos de sobrevivência de *F. graminearum* no resíduo sobre ou abaixo do solo por até 2 anos (Khongla & Sutton 1988; Pereyra & Dill-Macky, 2004). Apesar do patógeno poder sobreviver de forma livre no solo, esta fonte tem pouca importância como inóculo na dinâmica da doença quando comparado ao resíduo na superfície do solo (Shaner, 2003).

A sobrevivência de *F. graminearum* na resteva pode ser influenciada por fatores ambientais (especialmente temperatura e umidade), do hospedeiro e competição interespecífica (Leplat *et al.*, 2013). Em colmos de trigo naturalmente infectados a sobrevivência de *F. graminearum* tende ser menor que a de outras espécies do gênero, como *F. verticillioides*, outro patógeno importante da cultura do milho (Palazzini *et al.*, 2013).

O efeito dos restos culturais na lavoura, na intensidade das epidemias de giberela e da contaminação com DON em trigo, parece estar relacionado às condições ambientais e à resistência do hospedeiro uma vez que resultados contraditórios são observados na literatura (Dill-Macky & Jones 2000; Del Ponte *et al.*, 2003; Nita *et al.*, 2006; Landschoot *et al.*, 2013). Nita *et al.* (2006) não observaram efeito do aumento de inóculo na intensidade das epidemias de giberela

em condições extremas de favorabilidade à doença (muito desfavorável ou muito favorável). Landschoot *et al.* (2013) não observaram diferença na concentração de DON em grãos oriundos de parcelas com ou sem resíduo de milho na superfície, indiferente às condições ambientais da safra, mas a intensidade das epidemias foi mais alta nas parcelas com resteva de milho em ano favorável à giberela. Del Ponte *et al.* (2003) avaliou a incidência da giberela em quadriláteros de 70 campos de trigo no estado americano de Nova York (NY) e não observaram diferença na incidência de giberela em quadriláteros com ou sem resteva de milho.

### **2.6.2 Disseminação do inóculo**

Os dois tipos de inóculo, da fase sexual (ascósporos) e assexual (macroconídios) de *F. graminearum* podem, indistintamente, causar giberela (Sutton, 1982). Os ascósporos são reportados como inóculo primário na atmosfera para o desenvolvimento das epidemias (Fernando *et al.*, 1997) mas apesar da disseminação dos macroconídios ser governada por respingos de chuva e a curtas distâncias (Parry *et al.*, 1995), esses também podem constituir o inóculo atmosférico (Maldonado-Ramirez, 2001; Markell & Francl, 2003).

A concentração de ascósporos na atmosfera é favorecida após 2 a 3 dias consecutivos de chuva e com umidade relativa superior a 80% (Paulitz, 1996), declinando com mais de 3 dias consecutivos de chuva (Del Ponte *et al.*, 2005). Tipicamente, a densidade aérea média de esporos de *F. graminearum* foi estimada em 500 ascósporos por 1.000 m<sup>3</sup> de ar (Maldonado-Ramirez, 2001).

Na atmosfera, os ascósporos podem perder sua viabilidade pela ação da radiação ultra-violeta (UV) e pela desidratação (Beyer & Verreet, 2005) o que pode reduzir a capacidade de disseminação de inóculo viável a longas distâncias (Keller

*et al.*, 2013). A disseminação de ascósporos a longas distâncias não seria tão importante para as epidemias devido a perda de sua viabilidade quando expostos a condições de baixa umidade relativa (< 50%) e alta temperatura (> 30°C) (Bayer *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2008).

No entanto, estudos mostraram que inóculo viável de *F. graminearum* foi encontrado na baixa atmosfera em locais distantes de fontes potenciais do inóculo (Maldonado-Ramirez *et al.*, 2005; Schmale *et al.*, 2012). Aproximadamente 13.000 unidades formadoras de colônia (UFC) foram observadas por Maldonado-Ramirez *et al.* (2005) em vôos com veículo autônomo não tripulado (VANT) no centro do estado americano de Nova York com picos de coleta em vôos realizados entre as 0700 a 1000 h. Da mesma forma, Schmale *et al.* (2012), também com o uso de VANTs, capturaram isolados de *Fusarium* com vôos em altitudes de até 320 m acima do solo. Entre os isolados coletados, 11 identificados como *F. graminearum* (nove isolados 15-ADON, um isolado 3-ADON e um isolado NIV) foram patogênicos em uma cultivar de trigo suscetível. Com este estudo, Schmale *et al.* (2012) demonstraram que esporos viáveis e patogênicos de *F. graminearum* podem estar presentes na atmosfera e que barreiras atmosféricas podem estar relacionadas à disseminação de populações com genótipos tricotecenos raros (NIV) (Schmale *et al.*, 2011) no leste dos EUA.

A contradição gerada pelas possíveis restrições na sobrevivência dos esporos de *F. graminearum* e a coleta sistemática de esporos do patógeno na atmosfera levaram Keller *et al.* (2010) e Keller *et al.* (2011) a estudar a contribuição do inóculo local versus o inóculo externo à lavoura (*background inoculum*) nas epidemias de giberela nos EUA em campos de trigo/cevada, usando para isto técnicas baseadas na genotipagem de isolados por PCR pela introdução de



inóculo posteriormente rastreado (*fingerprint*) por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Os estudos foram conduzidos em campos com presença mínima de resíduos de milho. Keller *et al.* (2010) observaram que a incidência média de espigas com giberela causada por *F. graminearum* foi de 15, 2, 1 e < 1% a 0, 3, 6, e > 24 m, respectivamente, a partir de uma fonte local (1 m<sup>2</sup>) de colmos de milho inoculados com os isolados introduzidos. Comportamento similar foi observado mesmo quando foram utilizados maiores quantidades de inóculo (colmos de milho inoculados depositados no chão da lavoura) e analisando a incidência em cultivares de trigo suscetível ou moderadamente resistente à giberela (Keller *et al.*, 2011). Os resultados dos estudos de Keller *et al.* (2010, 2011) sugerem que o inóculo externo à lavoura é responsável por pelo menos 80% das infecções nas espigas e que os ascósporos “escapam” verticalmente do dossel da cultura e se movem a locais distantes, ao invés de permanecer na lavoura e causar a doença (Keller *et al.*, 2013).

Usando técnica similar a Keller *et al.* (2010, 2011), Prussin (2013) observou, por meio de coleta de 1.027 isolados em dois anos de estudo e com uma fonte de inóculo de 0,3 ha, que os clones viáveis de *F. graminearum* puderam ser recuperados em distâncias de até 750 m da fonte, demonstrando assim a capacidade de dispersão a longa distância.

### **2.6.3 Deposição do inóculo e sítios de infecção**

Em *F. graminearum* a deposição de esporos pode ocorrer sem a presença de chuva (deposição seca) ou com os esporos sendo “carregados” pelas gotas de chuva da atmosfera até o dossel da cultura (Keller *et al.*, 2013). Após algumas horas de

chuva a quantidade de esporos na atmosfera é reduzida até quase não serem mais observados esporos (Reis, 1990b; Paulitz, 1996; Del Ponte *et al.*, 2005).

Usando placas de Petri com meio semi-seletivo, estudos mostraram que a deposição de esporos ocorreu, majoritariamente (56 a 94% dos esporos coletados), durante o período noturno (Del Ponte *et al.*, 2005; Schmale *et al.*, 2006a). Eventos de chuva e alta umidade (>90%) coincidiram com os picos de coletas de UFC de *F. graminearum* (Del Ponte *et al.*, 2005).

O padrão espacial da deposição dos esporos tem sido determinado em sua maioria como aleatório (93%) sendo que o padrão agregado foi observado, principalmente, no período noturno e em situações de baixa turbulência atmosférica (Schmale *et al.*, 2005).

Após a deposição, os ascósporos e os macroconídios requerem, respectivamente, 53% e 80% de umidade relativa para a germinação (Beyer *et al.*, 2005), assim, os ascósporos teriam vantagem competitiva para a infecção do tecido suscetível do hospedeiro (Keller *et al.*, 2013).

A antese é a fase mais suscetível do trigo às infecções por *F. graminearum* (Sutton, 1982) e as anteras do trigo são o principal sítio de infecção, onde substâncias do hospedeiro podem favorecer o desenvolvimento do patógeno (Strange & Smith, 1971; Skinnis *et al.*, 2010).

Panisson *et al.* (2002) estudaram o efeito das anteras presas, ou parcialmente extrusadas, no estabelecimento das infecções de *F. graminearum*, e concluíram que essas podem ter um papel importante no estabelecimento das infecções e que prolongam o período de suscetibilidade do hospedeiro à doença. Del Ponte *et al.* (2007) e Cowger & Arrellano (2010) observaram que o período de suscetibilidade

pode se prolongar além do florescimento, em estádios de formação e enchimento dos grãos.

#### **2.6.4 Papel dos tricotecenos na patogenicidade e fatores relacionados à sua produção**

Estudos têm demonstrado que DON não é fator determinante para o estabelecimento das infecções (Proctor *et al.*, 1995; Eudes *et al.*, 2001), já que mutantes de *F. graminearum*, incapazes de produzir DON foram capazes de infectar as plantas de maneira similar ao isolado selvagem, porém foram incapazes de colonizar os tecidos das espigas de trigo com a mesma eficiência que o isolado parental (Proctor *et al.*, 1995; Desjardins *et al.*, 1996). Assim, uma correlação positiva entre a quantidade de DON produzida e a agressividade de isolados de *F. graminearum* vem sendo citada (Mesterházy *et al.*, 1999; Mesterházy, 2002).

Em um estudo de sumarização de coeficientes de correlação entre avaliações visuais da giberela e a concentração de DON em grãos de trigo, Paul *et al.* (2005b) analisaram 163 estudos, publicados e não publicados, e observaram que mais de 65% dos valores do coeficiente de correlação ( $r$ ), relacionando a incidência e a severidade com DON, foram acima de  $\geq 0,5$ . Além das avaliações visuais da intensidade, outros fatores relacionados ao ambiente, momento de infecção e resistência do hospedeiro, uso de fungicidas e capacidade toxigênica dos isolados prevalentes numa população, assim como interações complexas com tais fatores, influenciam decisivamente no acúmulo de micotoxinas em trigo (Mesterházy, 2002; Ramirez *et al.*, 2004; Wegulo *et al.*, 2012; Willyerd *et al.*, 2012; Spolti *et al.*, 2013a).

Estudos sobre o efeito do molhamento das espigas na intensidade da doença e na concentração de DON em trigo têm mostrado que, apesar dos períodos prolongados de irrigação após a antese poder aumentar a intensidade da doença, a concentração de DON pode tanto aumentar como reduzir (Culler *et al.*, 2007; Cowger *et al.*, 2009). Culler *et al.* (2007) observaram redução na concentração de DON nos grãos em tratamentos com períodos prolongados de irrigação. Contrariamente, Cowger *et al.* (2009) reportaram aumento na severidade de giberela, na incidência de grãos giberelados e no acúmulo de DON com o aumento da duração da irrigação da antese a 30 dias após. Além do molhamento, a atividade de água nos grãos e a temperatura também podem influenciar na síntese de tricotecenos (Ramírez *et al.*, 2004).

Cultivares de trigo resistentes à giberela, selecionadas pelos melhoristas com base no fenótipo da intensidade da doença, de maneira geral, tendem a apresentar menores valores de DON do que cultivares suscetíveis (Wilde & Miedaner, 2006). Entretanto, os mecanismos que governam a resistência do trigo com base nos sintomas visuais e o acúmulo de micotoxinas ainda não são bem conhecidos (McMullen *et al.*, 2012; Wegulo *et al.*, 2012). A menor intensidade de giberela e o menor acúmulo de DON nos grãos de cultivares resistentes pode estar relacionado à resistência inicial à infecção (resistência do Tipo I), à disseminação de *F. graminearum* na espiga (resistência do Tipo II) (Schroeder & Christensen, 1963; Mesterházy, 2006), à capacidade do hospedeiro em retardar a síntese das micotoxinas (Snijders, 2004) ou ainda em reduzir a sua toxidez (glicolização) (Lemmens *et al.*, 2005; Audenaert *et al.*, 2013).

O uso dos fungicidas é uma das principais táticas no manejo de giberela em trigo e acúmulo de micotoxinas como DON (McMullen *et al.*, 2012; Gilbert &

Haber, 2013). Dentre os fungicidas, aqueles da classe dos triazóis têm se apresentado como mais eficientes e recomendados para o controle da doença (Paul *et al.*, 2008; Wegulo *et al.*, 2011; Willyerd *et al.*, 2012).

Paul *et al.* (2008), resumiram, por meta-análise, dados de mais de 100 estudos de controle químico da giberela em trigo nos Estados Unidos e observaram que a mistura comercial de prothioconazole + tebuconazole e o metconazole foram os mais eficientes na redução de giberela ( $\mu = 52\%$ ) e de DON nos grãos ( $\mu = 45\%$ ).

O uso integrado de cultivares com níveis mais elevados de resistência com fungicidas triazóis aumenta a eficiência de controle da doença e de DON, no entanto o uso exclusivo da resistência varietal não garante o controle da doença e a concentração de DON nos grãos em níveis aceitáveis (Wegulo *et al.*, 2011; Willyerd *et al.*, 2012).

Além dos triazóis, as estrobilurinas são utilizadas no controle de outras doenças em trigo, como manchas foliares e ferrugens, no entanto, relatos de aumento de DON por estrobilurinas (azoxistrobina e trifloxistrobina) são citados com aplicações após o espigamento do trigo (Wegulo *et al.*, 2012). As causas deste efeito pelo uso de estrobilurinas ainda não são claras, mas podem estar associadas a alterações da fisiologia do trigo (Bertelsen *et al.*, 2001; Blandino *et al.*, 2006), insensibilidade natural das populações de *F. graminearum* a estrobilurinas (trifloxistrobina) (Dubos *et al.*, 2011), efeito seletivo, reduzindo a diversidade da população microbiana e favorecendo *F. graminearum* (Xu & Nicholson, 2009) e/ou por estimular a síntese de micotoxinas pelo patógeno (Zhang *et al.*, 2009).

Entretanto, Chen *et al.* (2012) na China e Spolti *et al.* (2013a) no Brasil observaram, em condições de campo, que o uso de piraclostrobina em mistura com

epoxiconazole (Chen *et al.*, 2012) ou metconazole (Spolti *et al.*, 2013a) pode controlar a giberela em trigo de maneira bastante eficiente, com aumento do rendimento da cultura e sem aumentar a concentração de micotoxinas nos grãos em comparação ao uso isolado de benzimidazol (carbendazim) ou de triazol (metconazol).

A redução da concentração de micotoxinas em grãos pode estar dissociada da eficiência de controle da giberela (Paul *et al.*, 2008), como efeito das condições ambientais, momento de infecção ou interação entre isolados e fungicidas (Mesterházy *et al.*, 2003; Ramirez *et al.*, 2004; Culler *et al.*, 2007; Del Ponte *et al.*, 2007; Cowger *et al.*, 2009; Spolti *et al.*, 2013a). Portanto, devido à complexidade dos fatores envolvidos na síntese de tricotecenos, a detecção e quantificação de níveis de micotoxinas nos grãos é essencial em estudos que avaliam a eficiência das práticas de manejo no controle de giberela.

#### **2.6.5 Quantificação das epidemias e relação incidência-severidade**

Nos estudos com giberela em trigo, tanto a incidência, proporção de espigas gibereladas numa amostra, como a severidade (também chamada de índice de giberela), ou seja, a proporção de espiguetas gibereladas em uma espiga, são as medidas visuais usualmente utilizadas para quantificar a intensidade da doença (Paul *et al.*, 2005a).

Avaliações de incidência são, via de regra, mais acuradas, rápidas, fáceis e de maior reprodutibilidade que a estimativa visual da severidade. No entanto, a severidade é considerada mais útil que a incidência na quantificação da intensidade das epidemias, para determinar os danos no rendimento da cultura (Casa *et al.*,

2004) e para determinar a eficiência das medidas para o manejo das doenças (Seem, 1984).

Além das limitações intrínsecas relacionadas às estimativas de severidade, a morfologia das espigas de trigo e a senescência natural podem contribuir com os erros na quantificação da severidade de giberela em trigo (Paul *et al.*, 2005a).

A existência de relações consistentes entre a incidência e a severidade podem favorecer a estimativa da severidade a partir da incidência (Seem, 1984). Assim, relações entre a incidência e severidade vêm sendo estudadas em diversos patossistemas em diferentes níveis hierárquicos (Xu & Madden, 2002; Suffert & Montfort, 2008; Carisse *et al.*, 2011; Gent *et al.*, 2012).

Para a giberela, três estudos da relação entre incidência e severidade são encontrados na literatura, sendo dois conduzidos nos EUA (Groth *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2005a) e um na Europa (Xu *et al.*, 2004).

Xu *et al.* (2004) e Paul *et al.* (2005a) utilizaram um modelo baseado na transformação complementar log-log (CLL) da incidência e da severidade para analisar a relação entre as variáveis. Paul *et al.* (2005a) utilizaram basicamente dados de parcelas experimentais inoculadas e não inoculadas. Já no trabalho de Xu *et al.* (2004) não há informação sobre uso de fungicidas, cultivares ou inoculações.

Nos estudos de Xu *et al.* (2004) e Paul *et al.* (2005a) a relação incidência-severidade foi consistente entre os anos e os locais, com coeficientes angulares similares para todas as situações. Xu *et al.* (2004) utilizaram um modelo único para descrever a relação incidência-severidade, apesar de diferenças no intercepto e no coeficiente angular entre os locais amostrados.

A intensidade das epidemias influencia a precisão da estimativa da severidade de giberela a partir da incidência, onde maior precisão ocorre em

situações de menor incidência. Ao contrário da intensidade das epidemias, o número de unidades amostrais e o padrão espacial da doença tem efeito mínimo na precisão da estimativa da severidade a partir da incidência (Paul *et al.*, 2005a).

### **2.6.6 Distribuição espacial da doença**

Assim como a deposição dos esporos, estudos do padrão espacial da doença têm mostrado um predomínio do padrão aleatório da giberela em campos de trigo, o que é condizente com o comportamento monocíclico da doença (El-Allaf *et al.*, 2002; Del Ponte *et al.*, 2003). Padrão agregado, sugerido com base em índices de dispersão, foi observado por Del Ponte *et al.* (2003) em três campos, num total de 70 amostrados, os quais apresentaram incidências mais altas de giberela e maior densidades de resteva de milho na lavoura.

Em estudo de padrão espacial em vários níveis hierárquicos, Wilhelm & Jones (2005) também observaram predomínio do padrão aleatório da incidência de giberela em quadriláteros de 6.561, 729 e 9 m<sup>2</sup>, assim como em transectos de 0,8 m lineares em espigas consecutivas.

Kriss *et al.* (2012b) analisaram a heterogeneidade espacial da incidência de giberela em trigo no estado de Ohio em múltiplos níveis hierárquicos i) dentro dos campos, ii) dentro dos condados, iii) entre os campos de um condado e iv) entre os condados. Os autores observaram que a menor heterogeneidade da incidência foi observada no menor nível hierárquico, ou seja, indicando aleatoriedade da incidência dentro dos campos, e maior heterogeneidade foi observada entre os campos e entre os condados, indicando agregação nesses níveis hierárquicos. Resultados semelhantes foram relatados por Wilhelm & Jones (2005).



A maior heterogeneidade na incidência de giberela em níveis maiores de hierarquia espacial está relacionada a fatores intrínsecos dos campos, como data de plantio, variedade de trigo, manejo da resteva, data da antese, condições ambientais e uso de fungicidas (Wilhelm & Jones, 2005; Kriss *et al.*, 2012b) e a menor heterogeneidade, no menor nível hierárquico, pode estar relacionado à dispersão do inóculo de *F. graminearum* ser tipicamente atmosférica e não por respingos de chuva (Kriss *et al.*, 2012b). Além disto, contribui o fato da doença não ter um comportamento policíclico (Sutton, 1982), o que poderia contribuir para um padrão agregado da doença com o aumento de sua intensidade a partir das infecções primárias (Gent *et al.*, 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Análise espacial e da relação incidência-severidade de giberela

##### 3.1.1 Área de estudo, amostragem e dados coletados

Lavouras comerciais de trigo foram amostradas no norte do Estado do Rio Grande do Sul entre os meses de outubro e novembro nas safras 2009 (n = 51 áreas), 2010 (n = 49) e 2011 (n = 60), totalizando 160 áreas (Figura 4).

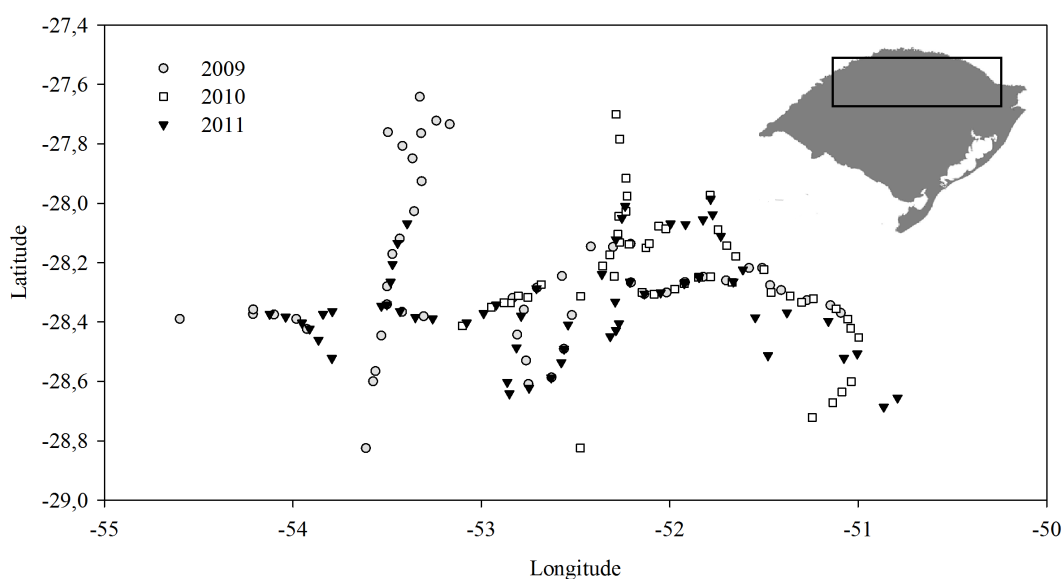


FIGURA 4. Localização geográfica das lavouras comerciais de trigo amostradas para giberela e coleção de isolados do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) no Rio Grande do Sul durante três anos.

Em cada área, 20 pontos de amostragem (distantes entre si em 10 m) de 1 m linear foram aleatoriamente definidos na lavoura. Em cada ponto, 10 espigas

adjacentes foram coletadas em perfílios principais. No laboratório, cada espiga foi avaliada visualmente para a incidência ( $I$ , a espiga tinha ou não sintomas de giberela) e a severidade ( $S$ , proporção de espiguetas giberelas) da giberela.

Para cada lavoura foram anotadas as coordenadas geográficas (latitude, longitude), a altitude em relação ao nível do mar (m), o estágio fenológico da cultura no momento da coleta (sensu Zadoks *et al.*, 1974), e a cultura cultivada no verão anterior (milho ou soja), determinada visualmente com base na resteva presente no local. Dados de cultivar, data de plantio e práticas de manejo não puderam ser obtidos.

### **3.1.2 Análise espacial de epidemias**

#### **3.1.2.1 Análise de heterogeneidade**

O padrão espacial da incidência de giberela dentro da lavoura foi determinado com base em índices de dispersão e ajuste à distribuição teórica dentre os campos. Para situações em que o índice de dispersão ( $D$ ) é estatisticamente maior que 1, como resultado da variância observada exceder a variância binomial esperada, infere-se agregação da doença (Madden & Hughes, 1995). O teste  $C(\alpha)$  foi aplicado para verificar a hipótese nula de agregação especificamente pela distribuição  $\beta$ -binomial como uma alternativa ao índice de dispersão ( $D$ ) (Madden & Hughes, 1995).

#### **3.1.2.2 Lei da potência binária**

A lei da potência binária (LPB) descreve a relação entre duas variâncias, a observada para uma proporção (no caso a incidência da giberela) e a variância

teórica esperada para uma distribuição binomial (Hughes & Madden, 1992; Madden & Hughes, 1995; Turechek *et al.*, 2011). A relação é descrita por:

$$S^2_{obs} = a * (S^2_{bin})^b \quad (1)$$

onde,  $S^2_{obs}$  é a variância observada,  $S^2_{bin}$  é a variância binomial teórica,  $a$  e  $b$  são parâmetros do modelo. A transformação logarítmica lineariza a relação entre as variáveis:  $\log(S^2_{obs}) = \log a + b * \log(S^2_{bin})$  com um coeficiente angular  $b$  e um intercepto  $\log(a)$ . O valor de  $b$  é um parâmetro fundamental na caracterização do padrão espacial da incidência (na escala da unidade amostral, no caso, campos amostrados) (Hughes & Madden, 1992). Quando  $b = 1$ , a magnitude da agregação não é dependente da incidência, com o valor de  $a$  representando de forma constante o índice de dispersão ( $D = S^2_{obs} / S^2_{bin} = a$ ). Quando  $b \neq 1$ , o índice de dispersão muda sistematicamente com a variação da incidência da doença e  $D = S^2_{obs} / S^2_{bin} = a * (S^2_{bin})^{(b-1)}$  (Hughes & Madden, 1992).

### 3.1.3 Relação incidência-severidade

#### 3.1.3.1 Modelagem da relação incidência ( $I$ ) e severidade ( $S$ )

A equação de Kono-Sugino foi utilizada para estimar a  $S$  a partir da  $I$  de giberela (McRoberts *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2005a). Os dados foram submetidos à análise de regressão por meio das equações:

$$CLL(S) = \alpha + \beta CLL(I) \quad (2)$$

$$CLL(S) = \alpha_i + \beta_i CLL(I) \quad (3)$$

onde,  $\alpha$  (intercepto) e  $\beta$  (coeficiente angular) são parâmetros do modelo, e  $\alpha_i$  e  $\beta_i$  são parâmetros separados para cada um dos fatores categóricos (safra, estágio fenológico e tipo de resteva) e  $CLL(\bullet)$  representam a transformação complementar log-log da incidência  $CLL(I) = \ln[-\ln(1-I)]$  e da severidade  $CLL(S) = \ln[-\ln(1-S)]$

(Paul *et al.*, 2005a). A significância da mudança no desvio de  $\alpha$  e  $\beta$  das equações 2 e 3 para cada fator categórico foi testada por teste de verossimilhança.

Teste t foi utilizado para determinar se o coeficiente angular da equação 2 era maior que 1, baseado na estimativa de  $\beta$  e seu erro padrão (Paul *et al.*, 2005a). O ajuste do modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação ajustado aos graus de liberdade ( $R_a^2$ ) e correlação entre a  $S$  e a severidade estimada ( $\hat{S}$ ) ( $R^{*2}$ ). Todas as estatísticas foram obtidas da regressão linear dos valores de  $S$  pela transformação  $CLL(S)$ , exceto  $R^{*2}$  que é uma medida da dispersão dos valores observados em relação ao valores preditos da severidade.

### 3.1.3.2 Precisão na estimativa da severidade a partir da incidência

A partir dos parâmetros estimados pela análise de regressão, os valores preditos da variável dependente [ $CLL(S)$ ] e o intervalo de 95% para a predição da variável dependente foram diretamente obtidos (Paul *et al.*, 2005a). A transformação inversa da variável dependente predita foi calculada para obter a  $\hat{S}$  e os intervalos de  $S$ . Sendo  $C\acute{L}L(S)$  a  $S$  predita transformada, a severidade predita  $\hat{S}$  foi calculada pela equação:

$$\hat{S} = 1 - \exp[-\exp(C\acute{L}L(S))] \quad (4)$$

O intervalo de 95% de predição de  $CLL(S)$  é igual a  $C\acute{L}L(S) \pm 2\sqrt{V}$  sendo  $V$  a variância de  $CLL(S)$  baseado nos parâmetros do modelo (erro quadrático médio, EQM).

Os valores de  $\hat{S}$  não são função linear de  $CLL(S)$ , sendo que a estimativa de  $S$  a partir de  $I$  possui viés (Paul *et al.*, 2005a) e portanto os intervalos de predição não são lineares e simétricos a  $\hat{S}$ , sendo calculados conforme:

$$\hat{S}_s = 1 - \exp[-\exp(CL\acute{L}(S)) + 2\sqrt{V}] \quad (5a)$$

$$\hat{S}_i = 1 - \exp[-\exp(CL\acute{L}(S)) - 2\sqrt{V}] \quad (5b)$$

### 3.1.3.3 Efeito da amostragem e do padrão espacial da doença na estimativa da severidade

Um das aplicações diretas de um modelo da relação  $I$ - $S$  é estimar a severidade a partir da incidência num levantamento da doença (Seem, 1984, Paul *et al.*, 2005a). Para tal, a incerteza da incidência deve ser calculada para se obter um intervalo de predição de  $S$ . A incerteza de  $I$  pode ser representada pela variância estimada da média de  $I$  numa amostra com  $N$  unidades amostrais (grupo de espigas) com  $n$  espigas por unidade amostral. Considerando que  $D$  é o índice de dispersão da doença a variância de  $I$  pode ser descrita por:

$$V = I(1-I)D/(nN) \quad (6)$$

Considerando o uso do  $CLL(S)$ - $CLL(I)$  neste estudo, assim como Paul *et al.* (2005a), a variância de  $I$  foi estimada pela fórmula:

$$V \approx [(\beta^2/(1-I)\ln(1-I)^2)D(I/nN) + EQM] \quad (7)$$

A equação 7 foi usada para estimar  $V$  nas equações 5a e 5b. Intervalos de predição da severidade de giberela foram obtidos sob várias condições teóricas de amostragem, em particular, com variação no padrão espacial da doença ( $D$ ) e no número de unidades amostrais ( $N$ ).

## **3.2 Biologia e ecologia do patógeno: espécies e potencial toxigênico**

### **3.2.1 Levantamento de isolados do patógeno em populações regionais**

Isolados do patógeno foram obtidos de espigas sintomáticas das lavouras visitadas (Figura 3), conforme descrito no item 3.1.1. A metodologia para a coleta de espigas foi idêntica à descrita no item 3.1.1 deste documento.

### **3.2.2 Caracterização de populações locais: saprofítica, aérea e patogênica**

#### **3.2.2.1. Características das áreas de estudo**

Três áreas experimentais foram semeadas na porção norte do Rio Grande do Sul durante a safra 2011. Os campos foram aqui nomeados de acordo com o município de localização: Santa Bárbara do Sul (SBA), Marau (MAR) e Vacaria (VAC), distantes entre si 260 a 240 km (Figura 5). Nos três campos, duas cultivares de trigo, BRS Guamirim e Quartzo classificadas, respectivamente, como moderadamente suscetível e suscetível à giberela, foram semeadas sob resteva de milho (cultivado no verão anterior).

#### **3.2.2.2. Quantificação de epidemias e micotoxinas**

A intensidade de giberela foi avaliada em 50 espigas de trigo aleatoriamente selecionadas nas três linhas centrais de cada um dos quatro blocos de parcelas sem a aplicação de fungicidas e levadas ao laboratório para avaliação visual da incidência e severidade.

As parcelas experimentais foram colhidas manualmente em uma área de 5 m<sup>2</sup> e trilhadas mecanicamente para a limpeza (Spolti *et al.*, 2013a). Nos grãos colhidos foram avaliadas a incidência de grãos giberelados (GG, %) baseado em

avaliação visual; e concentração das micotoxinas deoxinivalenol (DON), suas formas acetiladas (3-ADON e 15-ADON), além de nivalenol (NIV).

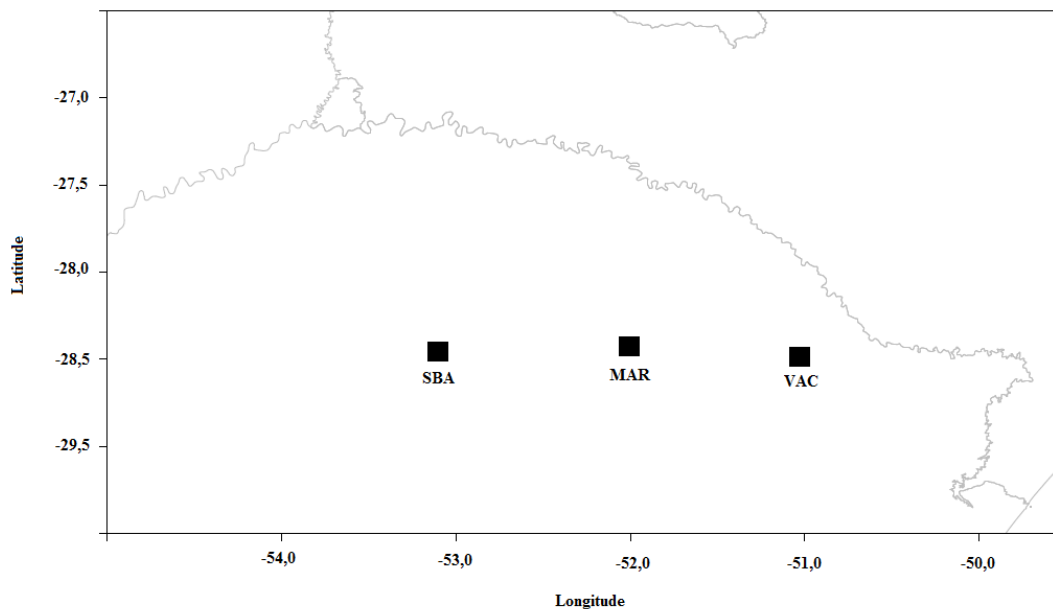


FIGURA 5. Localização das três áreas experimentais no Rio Grande do Sul onde três populações do patógeno foram obtidas da resteva, da atmosfera e de grãos de trigo giberelados, em 2011. Santa Bárbara do Sul (SBA); Marau (MAR) e Vacaria (VAC).

As micotoxinas foram extraídas seguindo o método QuEChERS (Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2012) e quantificadas por padrões externos. Todas as análises de micotoxinas foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os padrões da Sigma Chemicals Co foram diluídos (20 µg/ml do padrão/l) para a obtenção da curva padrão. A amostra foi injetada em um equipamento de HPLC equipado com UV-visível, detectores fluorescentes 10AXL e uma coluna (Discovery® Bio Wide Pore column; C18, 25 cm x 4,6 mm, 10 µm, Supelco). O comprimento de onda no detector UV foi de 219 nm. A fase móvel foi composta por água (A): metanol (B) em gradiente. O gradiente iniciou com 88% de A e 12% de B durante 8 min. Entre 9 a 18 min, a



concentração de B atingiu 100%. A partir de 19 min, o gradiente retornou a 88% de A e 12% de B, permanecendo nesta condição até 27 min. O fluxo foi de 1 ml/min e a injeção foi de 20  $\mu$ L.

### **3.2.3 Populações amostradas nas áreas**

Populações locais do patógeno amostradas nas três áreas estudadas (Figura 5) foram constituídas por isolados do patógeno coletados em três sítios distintos e denominados como população saprofítica, atmosférica ou patogênica.

Para compor a população saprofítica, na fase de alongamento do trigo cerca de 50 colmos de milho exibindo peritécios foram coletados de cada campo. A população atmosférica foi composta por isolados coletados em placa de Petri contendo meio de Nash-Snyder montadas em armadilhas caça-esporos do tipo estacionária posicionada cerca de 0,5 m acima do dossel da cultura (Del Ponte *et al.*, 2005; Schmale *et al.*, 2006ab). As amostragens foram feitas durante cinco noites consecutivas no período do florescimento da cultura. Em cada noite, cinco placas foram posicionadas às 1700 h e coletadas às 0900 h. Após cada período de coleta, as placas foram fechadas, vedadas e encaminhadas ao laboratório para incubação. Para compor a população patogênica, grãos de trigo giberelados oriundos das parcelas sem aplicação de fungicidas foram selecionados, desinfestados e incubados em BDA.

### **3.2.4 Procedimentos de isolamento e purificação**

Os isolados do levantamento regional (safras 2009, 2010 e 2011) foram obtidos a partir de espiguetas sintomáticas retiradas das espigas e incubadas em

câmara úmida. Após 7-10 dias os isolados foram obtidos de colônias típicas do CEFG. De cada espiga obteve-se apenas um isolado.

Os isolados das populações locais (safra 2011) foram obtidos de colônias típicas do CEFG de acordo com o meio utilizado e o tempo de incubação. Os isolados da população saprofítica foram obtidos pela imersão dos colmos de milho (1 x 3 cm) em solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 30 s, enxaguados 3x em água destilada esterilizada (ADE), secos em fluxo e armazenados a 4°C até o momento processamento. Para o processamento, fragmentos do colmo (1 x 1 cm) contendo peritécios foram retirados, desinfestados em etanol 70% por 30 s, hipoclorito de sódio 0,2% pelo mesmo tempo e enxaguados 3x com ADE. Com auxílio de lupa estereoscópica, um único peritécio foi removido do segmento e incubado em placas contendo BDA suplementado com estreptomicina na concentração de 40 mg/l (Leslie & Summerell, 2006; Pereyra & Dill-Macky, 2008).

As placas contendo meio semi-seletivo e posicionadas sobre o dossel da cultura foram incubadas por 5-7 dias em condições de temperatura (22°C) e luminosidade ambiente. Colônias com coloração salmão típicas de *F. graminearum* desenvolvidas no meio de cultura foram sub-cultivadas em BDA (Schmale *et al.*, 2006ab).

A população patogênica foi obtida de uma amostra de grãos giberelados desinfestados e incubados em BDA. Todos os isolados foram purificados por meio de cultivo monospórico e preservados conforme metodologia de rotina no laboratório (Scoz *et al.*, 2009).

### 3.2.5 Extração de DNA

Previamente à extração de DNA, os isolados foram cultivados em BDA por sete dias e o micélio foi removido, seco em papel filtro e armazenado a 4°C. O DNA genômico foi extraído com o uso do método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) com algumas modificações.

O micélio foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para microtubos (1,5 mL) onde 750 µL de CTAB [2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA (pH 8,0)] e 15µL de β-mercaptoetanol foram adicionados. Os tubos foram então incubados por 15 min a 65°C e 500 µL de uma solução cloroforme:álcool isoamílico (24:1) foi utilizada para as extrações. Após a centrifugação a 11.000 rpm por 10 min, 500 µL do supernadante foi transferido para outro microtubo e 5 µL de uma suspensão de RNase (20 mg/ml) foi adicionado. Os tubos foram então incubados em “banho-maria” a 37°C por 30 min.

O DNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol and 250 µL de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado. Após nova centrifugação a 11.000 rpm por 10 min, o supernadante foi descartado e o *pellet* lavado com 100 µL de uma solução de etanol 70%. O pellet foi re-suspendido em 100 µL de TE [10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,1 mM EDTA].

### 3.2.6 Identificação molecular das espécies e do genótipo tricoteceno

Os isolados foram simultaneamente identificados quanto à espécie filogenética e ao genótipo tricoteceno por genotipagem multilocus (MLGT) segundo a literatura (Ward *et al.*, 2008). O método MLGT é baseado na extensão de um *primer* específico para o alelo (Yli-Mattila *et al.*, 2009), tendo como alvo a

variação de seis genes específicos para as espécies e o quimiotipo tricoteceno (Ward *et al.*, 2008; Yli-Mattila *et al.*, 2009).

Para os isolados em que o MLGT falhou ou que produziu resultados inconclusivos devido à baixa qualidade do DNA, a identificação das espécies foi baseada na análise da sequência parcial do gene do fator de alongação (TEF-1 $\alpha$ ) (O'Donnell *et al.*, 1998) complementado pela similaridade da sequência pela busca na base de dados Fusarium ID do BLAST (<http://isolate.fusariumdb.org/blast.php>) (Geiser *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2011).

O genótipo tricoteceno dos isolados foi determinado por PCR multiplex pela amplificação de porções dos genes *Tri3* e *Tri12* (Ward *et al.*, 2002) como descrito previamente (Astolfi *et al.*, 2012).

Todas as análises moleculares de identificação dos isolados foram realizadas na unidade de estudo de bactérias e fungos de alimentos (*Bacterial Foodborne Pathogens & Mycology Research Unit*) do departamento de agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture, USDA*).

### **3.2.7 Teste de competitividade entre espécies**

Quatro cultivares de trigo com diferentes níveis de resistência à giberela foram usadas no teste de competitividade: BRS 194, classificada como suscetível, BRS Guamirim, classificada como moderadamente suscetível, cultivar Frontana, classificada como moderadamente resistente e, Sumai 3, classificada como resistente à giberela.

Dez sementes de cada cultivar foram semeadas em vasos (5 l) contendo substrato (1:1:1 húmus, solo e vermiculita) fertilizada com macronutrientes (10-10-

10 NPK). Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação onde a temperatura média foi de 25°C e a umidade relativa próximo a 60%.

As plantas foram inoculadas por aspersão com uma suspensão de macroconídios ( $1 \times 10^5$  esporos/ml) no estágio de grão leitoso (Del Ponte *et al.*, 2007). O inóculo foi composto por quatro isolados: dois isolados Fgra e dois isolados Fmer que foram previamente caracterizados como patogênicos (Spolti *et al.*, 2013b). A concentração final foi ajustada (v/v) com igual concentração para cada isolado (1:1:1:1).

Após a inoculação, as plantas foram individualmente cobertas com saco plástico e incubadas a 25°C por 48 h. Após, os sacos plásticos foram retirados e as plantas retornaram à casa-de-vegetação. Avaliação da severidade de giberela (proporção de espiguetas gibereladas numa espiga) foi realizada 16 dias após a inoculação (Spolti *et al.*, 2012).

O experimento foi delineado em blocos casualizados com três repetições, sendo que cada repetição foi composta por um vaso com dez espigas. No momento da maturação dos grãos ( $\approx$  40 dias após à inoculação), os grãos foram manualmente colhidos, limpos, e os grãos giberelados selecionados para recuperação de isolados após a desinfestação superficial e incubação em BDA.

Os isolados recuperados foram purificados por isolamento monospórico e identificados como um dos quatro isolados inoculados por compatibilidade vegetativa (McCallum *et al.*, 2004). Para tal, quatro discos de micélio (5 mm de diâmetro) de cada isolado inoculado foram equidistantemente posicionados na periferia de uma placa de Petri contendo meio de cultura V8-trigo (150 ml de suco V8, 20 g farinha de trigo integral e 20 g de ágar por 1 l de água) (McCallum *et al.*, 2004).

Um disco de micélio do isolado recuperado foi posicionado no centro das placas, e incubadas em temperatura ambiente ( $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ) e luz contínua. Após 10 dias, a presença de barreira vegetativa foi usada como indicativo de incompatibilidade das colônias. Todas as combinações (isolados recuperados \* isolados inoculados) foram avaliadas em duplicata. Estudos prévios mostraram que todos os isolados inoculados sempre mostraram a ausência de barreiras vegetativas quando pareados com seu clone.

### 3.2.8 Análise dos dados

O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ,  $P < 0,05$ ) foi usado para testar as diferenças na frequência dos genótipos tricotecenos agrupados por variáveis categóricas definidas no levantamento regional: ano, altitude do campo, cultura prévia, intensidade da epidemia e estágio fenológico da cultura no momento da amostragem.

O mesmo teste estatístico ou o teste exato de Fisher ( $P < 0,05$ ) foi usado para comparar as frequências dos genótipos tricotecenos entre as populações dos campos de SBA, MAR e VAC (Sommerhalder *et al.*, 2011; Von der Ohe & Miedaner, 2011; Boutigny *et al.*, 2013).

O teste exato de Fisher ( $P < 0,05$ ) foi utilizado para testar a frequência de recuperação dos isolados Fgra e Fmer das espigas inoculadas no ensaio de competitividade.

Análise de correspondência foi utilizada para descrever a relação i) entre a frequência dos genótipos tricotecenos e populações (saprofítica, atmosférica e patogênica) e, ii) entre a frequência de Fgra, Fmer e Fcor e estas populações de cada campo (Santa Bárbara, Marau e Vacaria) (Sanogo & Yang, 2004).

### **3.3 Caracterização de *fitness* de isolados norte-americanos com distinto potencial toxigênico**

#### **3.3.1 Isolados do fungo**

Uma amostra de cinquenta isolados de *F. graminearum* foram selecionados de uma coleção maior de isolados obtidos de espigas de trigo com sintomas de giberela em levantamento realizado na porção oeste do estado americano de Nova York, durante a safra 2011 (G.C. Bergstrom, dados não publicados).

Os isolados desta coleção foram previamente identificados quanto ao genótipo tricoteceno com o uso de PCR tendo como alvo os genes *Tri3* e *Tri12* (Ward *et al.*, 2002; Schmale *et al.*, 2011). Os genótipos tricotecenos foram recuperados numa frequência de 15% 3-ADON e 85% 15-ADON, e isolados NIV até o momento não foram recuperados (G.C. Bergstrom, dados não publicados).

Vinte e cinco isolados do genótipo 3-ADON e 25 do genótipo 15-ADON foram arbitrariamente selecionados de nove campos comerciais de trigo daquela região (Figura 6).

#### **3.3.2 Crescimento micelial e sensibilidade à temperatura**

Suspensões de esporos ( $10^3$  macroconídios/ml) foram obtidos de culturas mantidas em BDA  $\frac{1}{4}$  por cinco dias sob luz permanente (luz negra F40/350BL, Sylvania, Danvers MA).

Em placas de Petri de 9 cm contendo BDA, três colônias foram formadas após a deposição de uma alíquota de 5  $\mu$ l da suspensão de esporos seguindo os procedimentos propostos por Zhan & McDonald (2011): i) todo o meio foi preparado e vertido num único dia, por uma única pessoa; ii) uma pipeta eletrônica foi usada para verter em cada placa a mesma quantidade (7 ml) de BDA, iii) após a

inoculação das placas, as mesmas foram mantidas numa bancada antes de serem aleatorizadas nas câmaras de incubação e iv) todo o procedimento de inoculação foi realizado por uma única pessoa ao longo de um único dia.

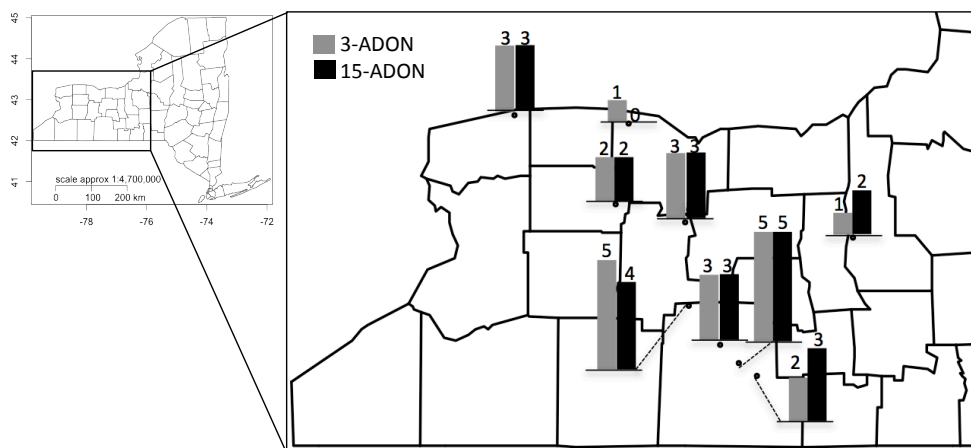


FIGURA 6. Número de isolados de *Fusarium graminearum* dos genótipos 3-acetil(A)deoxivalenol(DON) e 15-ADON usados neste estudo originários de nove lavagens amostradas no oeste do estado de Nova York em 2011.

As culturas foram incubadas em quatro temperaturas (15, 20, 25 ou 30°C) no escuro por cinco dias. Após, o diâmetro das colônias foi medido em duas direções e a taxa de crescimento (mm/dia) foi determinado. A taxa de crescimento foi comparada a 25°C (Ward *et al.*, 2008). A sensibilidade a temperatura foi obtida pela razão do crescimento micelial a 30°C e a respectiva taxa a 15°C (Zhan & McDonald, 2011). Três repetições (incubadoras) foram utilizadas para cada combinação de isolado (1 placa de Petri por isolado) e temperatura.

### 3.3.3 Formação de peritécios e ascósporos em meio de cenoura

A produção de peritécio e de ascósporos foi avaliada conforme protocolo padrão (Cavinder *et al.*, 2012). Brevemente, placas de Petri de 6 cm de diâmetro



com meio de cenoura (Klittich & Leslie, 1988) foram inoculadas no centro com cada um dos 50 isolados de *F. graminearum*.

Cada placa de Petri foi colocada sob luz fluorescente (C-14, Underwriters Laboratories Inc., Northbrook IL) em temperatura ambiente (23°C) permanecendo nestas condições por 5 dias, quando o crescimento micelial atingiu a borda das placas. O micélio aéreo foi então removido com uma palito esterilizado e uma alíquota de 1 ml de 2,5% Tween 60 foi adicionada à superfície do meio.

Após três e cinco dias à retirada do micélio, a formação de peritécios foi visualmente avaliada (Chen & Zhou, 2009; Cavinder *et al.*, 2012). A capacidade de formação de peritécios foi quantificada com uma escala proposta: - (sem a formação de peritécio), +, ++ e +++ quando 1 a 10%; 11 a 30%, e > 30% da área da Placa de Petri estava coberta por peritécios, respectivamente.

Após seis dias à aplicação da solução de Tween, seis discos de 1 cm de diâmetro foram retirados de cada placa. Os círculos foram cortados ao meio e três metades foram posicionadas em contato com lâminas de microscopia. As lâminas foram então colocadas em câmara úmida durante a noite sob luz fluorescente contínua e os ascósporos acumulados nas lâminas lavados e quantificados com hemacitômetro. Foram utilizadas quatro câmaras úmidas (repetições) com 50 lâminas cada (uma lâmina/isolado).

### **3.3.4 Formação de peritécios e produção de ascósporos em colmos de milho**

Segmentos de colmos de milho (5 cm x 2 cm) incluindo o entre-nó foram imersos em ADE por 10 h e autoclavados por três dias consecutivos. Os colmos esterilizados foram então inoculados com 15 discos de micélio BDA (5 mm de diâmetro, 2 mm de profundidade) colonizados com cada um dos 50 isolados e

incubados em câmara úmida (100% U.R) em temperatura ambiente ( $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ). Uma semana após a inoculação, os discos do meio de cultura haviam sido consumidos pelo crescimento fúngico.

Vinte e um dias após, os colmos de milho foram incubados por dois dias adicionais sob luz fluorescente (C-14, Underwriters Laboratories Inc., Northbrook IL) para a liberação de ascósporos (Maldonado-Ramirez, 2001). O número de ascósporos liberados dos colmos foi estimado pelo número de UFC contadas em placas de ágar-água posicionadas 1,5 cm acima dos segmentos durante estes dois dias. Quatro repetições (câmaras úmida) com cem segmentos de colmo (dois por cada isolado) foram utilizadas.

A capacidade de formação de peritécio não foi discriminada por um teste estatístico mas utilizada como uma característica descritiva (Chen & Zhou, 2009) dos grupos de genótipo tricoteceno em meio de cenoura e nos colmos de milho inoculados.

### **3.3.5 Agressividade em cultivar de trigo suscetível à giberela**

Sementes de 'Norm', cultivar de trigo de primavera altamente suscetível à giberela, foram semeadas em potes de barro de 15,3 cm de diâmetro (10 sementes/pote) contendo substrato *Cornell Mix* (96 l de turfa, 110 l de vermiculita, 9,1 kg de calcário dolomítico e 2,7 kg de fertilizante 11-5-11). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por oito semanas em temperatura de 20 a 25°C com luminosidade variando de 12 a 14 h/dia e desbastadas para manter apenas os dez perfilhos principais em cada vaso. As plantas foram mantidas na casa de vegetação da semeadura até a inoculação (Crane *et al.*, 2013).

As espigas de trigo foram inoculadas no estágio de grão leitoso (Zadoks 73), previamente determinado como o estágio mais suscetível na cv. Norm (Del Ponte *et al.*, 2007). A espiguetas central de cada espiga foi marcada e uma alíquota de 20 µl de uma suspensão de esporos ( $5 \times 10^4$  macroconidia/ml) foi inoculada no interior da espiguetas. Os vasos foram individualmente cobertos com saco plástico e mantidos por 48 h em câmara de crescimento com temperatura de 25,5°C e com ciclo de 15h/9h luz/escuro. Os sacos foram então removidos e as plantas mantidas na mesma câmara até a colheita ( $\approx$  45 dias após a inoculação).

A agressividade de cada isolado foi determinada pela avaliação da proporção de espiguetas com sintomas de giberela (considerando toda a espiga e para espiguetas abaixo ou acima da espiguetas central) em cada espiga inoculada após 10 dias à inoculação. Pelo fato de apenas um vaso por isolado ter sido usado, as dez espigas foram consideradas pseudorepetições.

A produção de micotoxina por cada um dos cinquenta isolados foi avaliada pela combinação de todas as espigas inoculadas. Antes da análise química, os grãos colhidos foram moídos e uma amostra de 5 g para cada isolado obtida. A quantidade de DON e de suas formas acetiladas (15-ADON e 3-ADON) foi quantificada usando o método de cromatografia de massa (GC-MS) (Mirocha *et al.*, 1998; Fuentes *et al.*, 2005).

### **3.3.6 Análise dos dados**

Para todos os experimentos, exceto a avaliação da agressividade, foi utilizado delineamento em blocos casualizados e os experimentos foram realizados duas vezes. Para as análises univariadas, todas as variáveis listadas nas Tabelas 7 e

8 foram submetidas a análise de variância por teste de permutação (Pillar & Orlóci, 1996).

A significância do teste de permutação ( $P < 0,05$ ) para comparação dos grupos tricotecenos foi avaliada pela comparação do teste estatístico observado com a distribuição de 10.000 permutações. Para determinar a diferença estatística entre os dois grupos dos genótipos tricotecenos na agressividade, o intervalo de confiança (IC 95%) da severidade na cultivar Norm foi utilizado.

Para a análise de correlação (coeficiente de Spearman), análise de componentes principais (ACP) e a análise de agrupamento, todos os dados de caracterização listados na Tabela 7 (usando a taxa de crescimento micelial a 25°C) e na Tabela 8 (além da severidade de giberela nas espiguetas acima ou abaixo da espiguetas central) foram utilizados para gerar uma matriz com os dados médios das repetições e dos experimentos para cada isolado. Isto gerou uma matriz com 50 isolados (linhas) e 14 variáveis (colunas). Para a análise de agrupamento e de ACP foi utilizado 10.000 permutações para verificar a nitidez dos grupos formados e a estabilidade dos eixos de ordenação (Pillar, 1999a, Pillar, 1999b).

Para a análise de agrupamento, a soma dos quadrados foi utilizado como critério de agrupamento baseado no índice de Gower como medida de semelhança assumindo como grupos nítidos quando  $P \geq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com auxílio do software MULTIV versão 2.4 (Pillar, 2006).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Análise espacial e da relação incidência-severidade de giberela**

#### **4.1.1 Resultados**

##### **4.1.1.1 Intensidade das epidemias**

No momento da visita, o estágio fenológico (sensu Zadoks *et al.*, 1974) das lavouras variou entre os estádios 71 a 89, com 59% das lavouras nos estádios mais avançados (81-89) (Tabela 2). A maioria dos campos apresentaram resteva de soja (64%), outros com resteva de milho (35%) (Tabela 2) e apenas um campo com resteva de batata.

A intensidade das epidemias, representada pela incidência e a severidade da giberela, variou entre as safras, sendo os menores valores observados na safra 2011 e valores similares em 2009 e 2010 (Tabela 2, Figura 7). Menores valores foram encontrados nos estádios 71-73 do que nos mais tardios (Tabela 2, Figura 7). Não se observou diferença na intensidade das epidemias em campos com resteva de milho ou de soja (Tabela 2).

TABELA 2. Intensidade de giberela em diferentes estádios fenológicos de cultivo do trigo em lavouras conduzidas sobre resteva de milho e soja no norte do Rio Grande do Sul, safras 2009, 2010 e 2011.

Dados <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	Incidência (%) <sup>c</sup>	Severidade (%)
<b>Safra</b>			
2009	51	33,9 ± 5,9	3,3 ± 1,0
2010	49	36,6 ± 5,7	4,2 ± 1,3
2011	60	15,3 ± 3,2	0,9 ± 0,2
<b>Estádio</b>			
71 - 73	33	18,4 ± 5,3	1,2 ± 0,4
75 - 77	31	38,2 ± 7,5	3,6 ± 1,3
81 - 89	95	27,8 ± 4,1	2,9 ± 0,8
<b>Resteva</b>			
Milho	56	24,9 ± 5,5	2,0 ± 0,8
Soja	103	29,6 ± 3,9	3,0 ± 1,0
<b>Todos</b>	<b>160</b>	<b>27,9 ± 3,1</b>	<b>2,7 ± 0,6</b>

<sup>a</sup> Dados originários de 160 lavouras comerciais de trigo amostradas no norte do Rio Grande do Sul.

<sup>b</sup> Número de lavouras amostradas. Estádio fenológico sensu Zadoks *et al.* (1974).

<sup>c</sup> Incidência e severidade médias de giberela e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%).

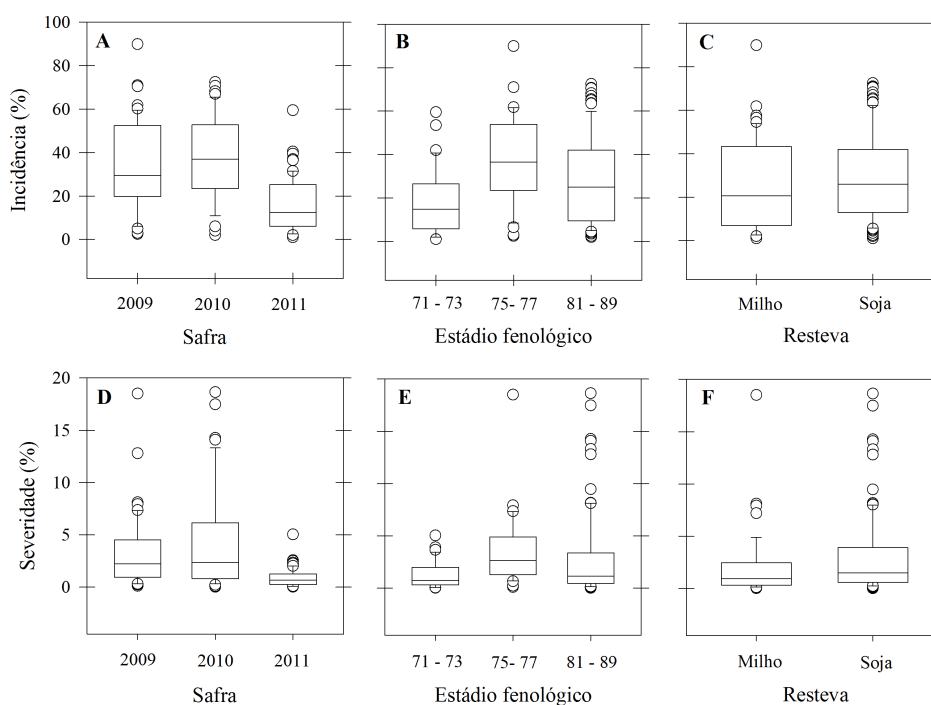


FIGURA 7. Distribuição dos valores de incidência (A, B, C) e severidade (D, E, F) de giberela nas safras 2009 a 2011 (A, D), nos estádios fenológicos (sensu Zadoks *et al.*, 1974) (B, E), e em lavouras com resteva de milho ou soja (C, F). A linha dentro das caixas representa a mediana e as linhas superiores e inferiores das caixas representam os *quartis* de 75% e 25% dos dados, respectivamente. As barras verticais além das caixas representam os *quartis* de 10% e 90% dos dados, e os círculos indicam os valores discrepantes.

#### 4.1.1.2 Análise de heterogeneidade

##### a) Índice de dispersão ( $D$ ) e teste $C(\alpha)$

Os testes de heterogeneidade mostraram resultados idênticos e sugeriram um predomínio do padrão espacial aleatório da doença (Figura 8). Evidência de agregação ( $D > 1$ ,  $P < 0,05$ ) foi detectada em 18% das lavouras.

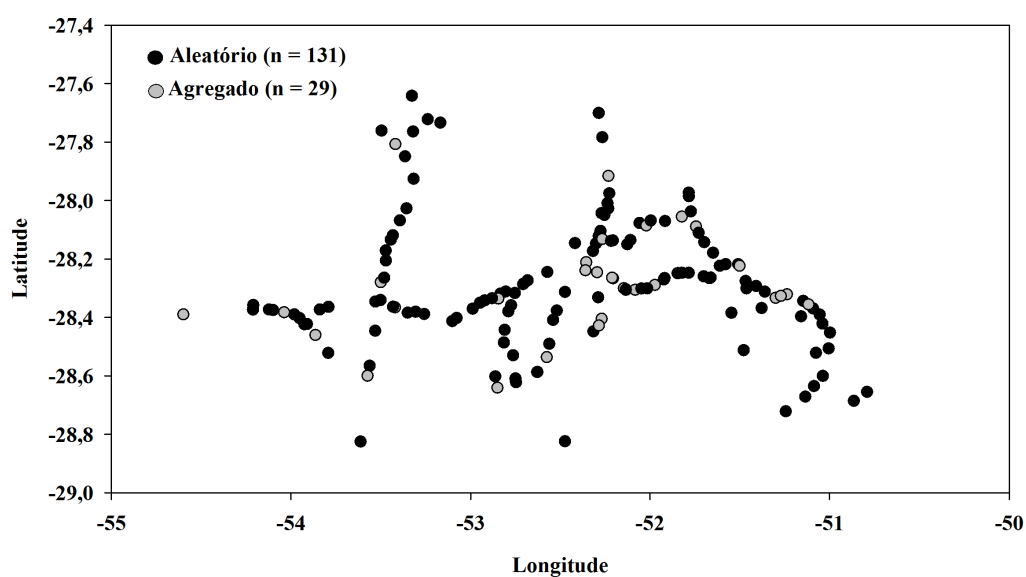


FIGURA 8. Localização de 160 lavouras comerciais de trigo (círculos) da porção norte do estado do Rio Grande do Sul visitadas entre os anos de 2009 e 2011 e padrão espacial da incidência de giberela dentro das lavouras. Padrão espacial da incidência de giberela (aleatório ou agregado) com base no índice de dispersão ( $D$ ). Quando o  $D > 1$  ( $P < 0,05$ ), infere-se a agregação da doença.

O índice de dispersão ( $D$ ) da incidência de giberela variou de 0,40 a 6,98, sendo  $>3$  em apenas três lavouras (Figura 9a). Entre os campos com agregação, a incidência de giberela variou de 5% a 71% (Figura 9b). A frequência de campos com agregação de giberela não variou entre anos ( $\chi^2 = 4,29$ ;  $P = 0,117$ ), estádios fenológicos ( $\chi^2 = 0,183$ ;  $P = 0,913$ ) e campos com de resteva de milho ou de soja ( $\chi^2 = 0,543$ ;  $P = 0,461$ ).

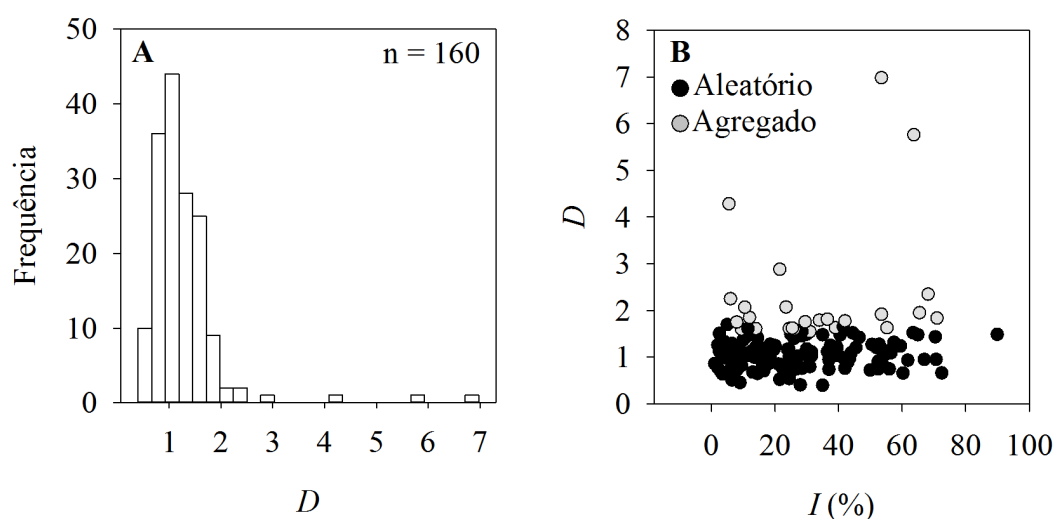


FIGURA 9. Distribuição da frequência do índice de dispersão ( $D$ ) e relação entre  $D$  e a incidência de giberela ( $I$ ) determinada em 20 pontos de amostragem por lavoura (A) e da relação  $I$ - $D$  (B). Quando o  $D > 1$  ( $P < 0,05$ ), infere-se a agregação da doença.

#### b) Lei da potência binária

Os parâmetros  $a$  e  $b$  obtidos do ajuste do modelo da lei de potência binária (LBP) aos dados dos logaritmos das variâncias não diferiram significativamente de 1 ( $a = b = 1$ ), sendo  $a = 1,05$  (IC95% 0,91 a 1,21) e  $b = 1,03$  (IC95% 0,92 a 1,08) (Figura 10). Assim, infere-se padrão espacial aleatório de giberela, sem modificação do mesmo com o aumento da incidência da doença.



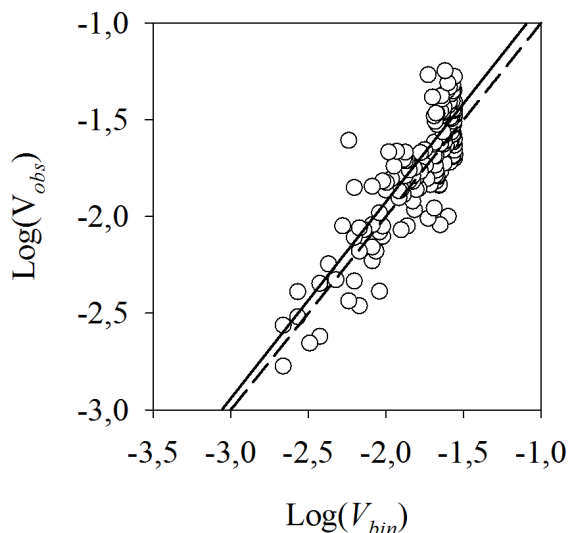


FIGURA 10. Relação entre o logaritmo da variância binária ( $V_{bin}$ ) e o logaritmo da variância observada ( $V_{obs}$ ) da incidência de giberela em 160 lavouras comerciais de trigo amostradas no Rio Grande do Sul entre as safras 2009 a 2011. A linha contínua representa o ajuste dos dados à equação  $\log(V_{obs}) = \log(a) + b \log(V_{bin})$  e a linha pontilhada ao modelo teórico em que  $V_{obs} = V_{bin}$  com  $a$  e  $b$  igual a 1.

#### 4.1.1.3 Relação incidência ( $I$ ) – severidade ( $S$ )

##### a) Modelagem da relação $I$ - $S$

Baseado nos valores de  $R_a^2$ , o modelo  $CLL(I)$ - $CLL(S)$  ajustou-se adequadamente para a maioria dos conjuntos de dados separados para cada uma das safras, estádios fenológicos e cultivo de verão. Com exceção das safras 2010 e 2011, mais de 75% da variação da  $S$  transformada pôde ser explicada pela  $I$  (Tabela 3). Os interceptos ( $\alpha$ ) estimados variaram de -2,49 a -3,24 e os coeficientes angulares ( $\beta$ ) variaram de 0,92 a 1,41 (Tabela 3). Tanto  $\alpha$  como  $\beta$  estimados pela regressão linear foram significativos e variaram entre os conjuntos de dados (Tabela 3).

TABELA 3. Sumário das análises de regressão da relação entre  $CLL(I)^a$  e  $CLL(S)^b$  de giberela para nove conjunto de dados de acordo com a safra, estágio fenológico no momento da amostragem, cultura da resteva presente na lavoura e todos os dados.

Dados <sup>c</sup>	Estatísticas <sup>e</sup>									
	N <sup>d</sup>	$\alpha$	se ( $\alpha$ )	$\beta^f$	se( $\beta$ )	R <sub>a</sub> <sup>2</sup>	R <sup>*2</sup>	EQM	F	I <sub>s2,5%</sub> <sup>g</sup>
Safra										
2009	51	-2,757	0,09	1,039	0,07	0,80	0,91	0,224	248,5	0,34
2010	49	-2,498	0,15	1,411*	0,11	0,56	0,69	0,522	178,7	0,35
2011	60	-3,247	0,20	0,928	0,08	0,69	0,80	0,414	128,4	0,46
Estádio <sup>h</sup>										
71 - 73	34	-3,104	0,24	0,957	0,10	0,76	0,85	0,506	84,7	0,42
75 - 77	31	-2,890	0,17	0,940	0,10	0,86	0,90	0,194	86,1	0,35
81 - 89	95	-2,634	0,12	1,231*	0,06	0,80	0,78	0,438	377,2	0,35
Resteva										
Soja	56	-2,662	0,11	1,177*	0,07	0,76	0,75	0,491	325,4	0,34
Milho	103	-2,936	0,12	1,057*	0,06	0,86	0,93	0,291	321,7	0,39
Todos	160	-2,756	0,09	1,127*	0,05	0,79	0,80	0,424	614,2	0,32

<sup>a</sup> Transformação complemento log-log da incidência de giberela,  $\ln(-\ln(1 - I))$ .

<sup>b</sup> Transformação complemento log-log da severidade de giberela,  $\ln(-\ln(1 - S))$ .

<sup>c</sup> Dados originários de 160 lavouras comerciais de trigo amostradas no norte do Rio Grande do Sul.

<sup>d</sup> Número total de observações (pares de incidência e severidade média) utilizados nos modelos de regressão. Não foram observados dados com incidência de 0%.

<sup>e</sup> Intercepto ( $\alpha$ ) e coeficiente angular ( $\beta$ ) estimados das regressões lineares; se = erro padrão da estimativa; R<sub>a</sub><sup>2</sup> = coeficiente de determinação ajustado; R<sup>\*2</sup> = correlação entre a severidade e a severidade predita; EQM = erro quadrático médio; e valor de F = estatística F da regressão. Todos os valores de F foram altamente significativos ( $P < 0,001$ ), indicando que  $\beta$  foi diferente de 0.

<sup>f</sup> \* Indica que o coeficiente angular foi maior que 1 ( $P < 0,05$ ) baseado no teste t.

<sup>g</sup> Incidência de giberela correspondente a uma severidade de 2,5%.

<sup>h</sup> Estádio fenológico da cultura (sensu Zadoks *et al.*, 1974).

Os interceptos estimados para o conjunto total de 160 pares  $I-S$  foram iguais a -2,75 (IC95%  $\pm$  0,25) e o coeficiente angular igual a 1,12 (IC95%  $\pm$  0,28) (superior a 1,  $P < 0,001$ ) (Tabela 3). Cerca de 80% da variação na  $S$  transformada foi explicada pelo modelo utilizando o conjunto completo de dados de incidência e severidade.

Apesar da variação nos parâmetros de  $\alpha$  e  $\beta$  estimados pela regressão, não foi observada evidência do efeito das co-variáveis safra, estágio fenológico e cultura na relação  $I-S$  ( $P$  de  $\beta \geq 0,197$ ) (Tabela 4). Portanto, a relação foi resumida por uma única equação para todos os campos (Tabela 3, Figura 11).

TABELA 4. Teste de verossimilhança dos fatores de covariância no ajuste do modelo complementar log-log na relação dos valores transformados de incidência ( $I$ ) e severidade ( $S$ ) de giberela em lavouras de trigo na porção norte do estado do Rio Grande do Sul, safras de 2009 a 2011.

Fator adicionado	Intercepto ( $\alpha$ )		Coef. Angular ( $\beta$ )		$\alpha$ e $\beta$	
	$\Delta$ Desvio <sup>a</sup>	$P$	$\Delta$ Desvio	$P$	$\Delta$ Desvio	$P$
Ano da safra	0,091	0,014	0,011	0,620	0,127	0,017
Estádio fenológico	0,051	0,105	0,002	0,932	0,092	0,078
Resteva	0,054	0,028	0,019	0,197	0,054	0,090

<sup>a</sup> Mudança no desvio da equação 2 em relação à equação 3. Ou seja, mudança no intercepto e no coeficiente angular na comparação dos dados agrupados ou ajustados para cada safra, estágio fenológico ou tipo de resteva.

### b) Precisão na estimativa da severidade a partir da incidência

A severidade foi estimada de forma mais precisa (menor IC95%) com valores inferiores de incidência (< 40%) em comparação a valores mais altos de incidência (> 40%). A amplitude do IC95% de predição aumentou com o aumento da incidência até o valor máximo de incidência observada (Figura 11).

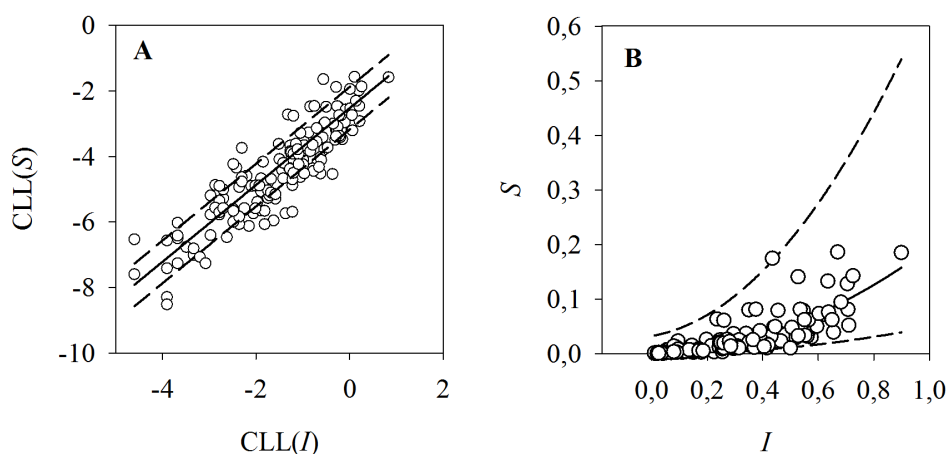


FIGURA 11. Relação entre a incidência ( $I$ ) e a severidade ( $S$ ) de giberela pela transformação complemento log-log (A) e com dados não-transformados (B). Cada ponto representa médias de  $I$  e  $S$  de giberela em 200 espigas de cada lavoura de trigo, de um total de 160 lavouras, amostradas aleatoriamente no estado do Rio Grande do Sul, 2009 a 2011. As linhas sólidas nos dois gráficos representam a severidade predita pela transformação complementar log-log (A) e pela transformação inversa da severidade predita (B). Linhas pontilhadas representam o limites superior e inferior do IC95% da predição.

### c) Efeito da amostragem e do padrão espacial na estimativa da severidade a partir da incidência

Quando a incerteza na estimativa da incidência foi considerada na precisão da estimativa da severidade, o índice de dispersão da doença ( $D$ ) (Figura 12a) e o número de unidades amostrais ( $N$ ) (Figura 12b) tiveram efeito marginal na precisão da estimativa da severidade pela incidência. Uma amplitude levemente maior foi observada pela combinação da redução no número de unidades amostrais ( $N=10$ ) com  $D$  indicando agregação da doença ( $D=3$ ) (Figura 12c).

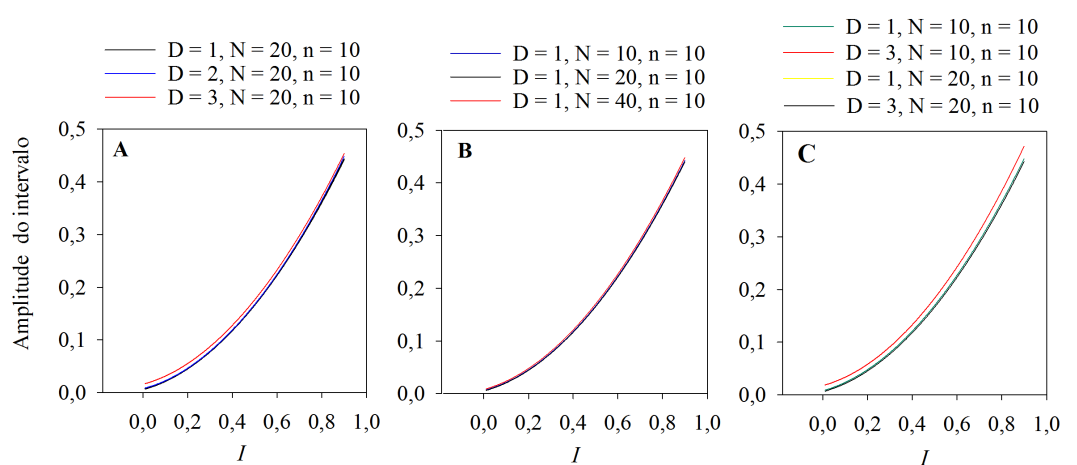


FIGURA 12. Amplitude dos intervalos de 95% de predição da severidade (IC95% severidade) a partir da incidência de giberela ( $I$ ) para valores de incremento no índice de dispersão ( $D$ ), nas unidades amostrais ( $N$ ) (B) e para a combinação de  $D$  e  $N$  (C). Resultados baseados na regressão considerando o conjunto total de 160 lavouras (Tabela 3), com número ( $n$ ) constante de 10 espigas por unidade amostral.

#### 4.1.2 Discussão

A ocorrência e a intensidade de epidemias de giberela são extremamente dependentes de condições climáticas sazonais (Del Ponte *et al.*, 2009). No presente estudo, o ano de 2011 pode ser considerado como não epidêmico, devido aos baixos valores de incidência na maioria das lavouras de trigo da principal região produtora do Estado do Rio Grande do Sul. Em um estudo de modelagem de risco que considerou variáveis meteorológicas no período anterior e posterior ao

florescimento do trigo, o ano de 2011 também foi classificado como não epidêmico para o sul do Brasil com base nos mapas de risco gerados no estudo de Fernandes & Nicolau (2013).

Estudos anteriores (Wilhelm & Jones, 2005; Kriss *et al.*, 2012b) mostraram que a frequência dos valores de incidência de giberela tende a ser mais heterogênea quanto mais alto é o nível de hierarquia espacial (dentro do campo, entre campos, entre regiões) avaliado. Ou seja, há maior variação da incidência entre lavouras (nível regional) do que dentro de uma lavoura (nível da lavoura) (Wilhelm & Jones, 2005; Kriss *et al.*, 2012b). No nível regional, fatores intrínsecos às lavouras como nível de resistência da cultivar, o uso de fungicidas, condições ambientais nas fases de floração e enchimento dos grãos podem explicar essa variação na intensidade de giberela entre as lavouras. Além desses, existem evidências de que infecções tardias, ou seja, posteriores ao florescimento, podem ocorrer sob condições favoráveis (Del Ponte *et al.*, 2007; Cowger & Arrellano, 2010). Tal fato pode estar relacionado com as mais altas incidências de giberela observadas nos estádios mais tardios, uma vez que pouco se sabe sobre a ocorrência de ciclos secundários para a giberela. Assim, o aumento da intensidade da doença ocorre por expansão das lesões e por novas infecções na disponibilidade de tecido suscetível.

Como nos estudos anteriores, foi observado um predomínio de padrão aleatório da incidência da giberela nas lavouras do Rio Grande do Sul sob sistema plantio direto. A agregação da doença não esteve sob influência de nenhum dos fatores avaliados e apenas três lavouras mostraram evidência de forte agregação, o que contrasta com estudos na América do Norte onde o padrão agregado da giberela foi mais comumente detectado em lavouras com abundância de resteva de

milho ou com mais alta incidência da doença (El-Allaf *et al.*, 2002; Del Ponte *et al.*, 2003).

Fatores que podem influenciar na quantidade e a distribuição do inóculo local, como idade da resteva (Khonga & Sutton, 1988) e a densidade de resteva (massa de resteva presente na lavoura) (Del Ponte *et al.*, 2003) podem, talvez, explicar a agregação da doença em alguns casos, mas tal informação não estava disponível.

No Brasil, diferente dos Estados Unidos, o plantio direto é utilizado em praticamente todas as lavouras, o que pode favorecer o aumento de inóculo de *F. graminearum* na atmosfera, já demonstrado estar presente em abundância no período de florescimento de uma safra (Del Ponte *et al.*, 2005) ou de várias safras (Fernandes & Nicolau, 2013) na região produtora. Assim, a presença e importância do inóculo atmosférico (Keller *et al.*, 2010, 2011), o padrão aleatório da deposição do inóculo atmosférico (Schmale *et al.*, 2005), sem evidências claras de ciclos secundários quando avaliados os perfis primários (Fernando *et al.*, 1997) podem explicar o predomínio do padrão aleatório da giberela, concordando com estudo anterior (Del Ponte *et al.*, 2003).

Ainda, a ocorrência da giberela indiferente do tipo de resteva, onde supostamente o milho seria uma fonte de inóculo mais importante do que soja, por exemplo, sugere que o inóculo local (dentro da lavoura) tem menor importância do que o inóculo atmosférico originado das múltiplas fontes de inóculo (de dentro e fora da lavoura) em regiões com alta densidade de resteva devido ao plantio direto, como é o caso do sul do Brasil.

A lei da potência binária foi utilizada anteriormente para descrever o padrão espacial da incidência de sarna da macieira (*Venturia inaequalis*) em folhas e ramos

(Carisse *et al.*, 2011) e de míldio (*Pseudoperonospora humuli*) em ramos de lúpulo (Gent *et al.*, 2012). Em ambos estudos, com duas doenças tipicamente policíclicas, o parâmetro  $b$  foi diferente de 1, indicando que a heterogeneidade espacial mudou sistematicamente com a incidência da doença, diferindo assim da giberela que se comporta tipicamente como monocíclica devido ao relativamente curto período suscetível (Sutton, 1982). A capacidade de dispersão a longa distância dos ascósporos produzidos na resteva, os quais independem de respingos de chuva para liberação e disseminação, associado com a maior distância relativa das espigas em relação à resteva, comparado com inóculo de doenças foliares, podem minimizar o efeito que uma possível distribuição agregada da resteva, contendo inóculo primário, poderia ter no padrão espacial da giberela. No caso do plantio direto, a resteva está distribuída de maneira aleatória e abundantemente na região fazendo com que o inóculo primário que atinja as espigas seja oriundo de múltiplas fontes de inóculo.

O modelo complemento log-log teve um ajuste adequado para todas as situações da relação  $I-S$  com alguma variação nos parâmetros do modelo entre os anos, estágio fenológico da cultura no momento da amostragem e tipo de resteva. Da mesma forma, Paul *et al.* (2005a) observaram variação entre conjuntos de dados de diferentes experimentos de giberela (teste de fungicidas, avaliação de cultivares), e variações semelhantes em outros patossistemas foram observadas quando comparados locais/estações de cultivo (Silva-Acuna *et al.*, 1999), momento da amostragem (Carisse *et al.*, 2011) e distância da fonte de inóculo (Pataky *et al.*, 1988).

O modelo complemento log-log explicou de 56% a 86% da variação na severidade, similar aos valores relatados no estudo conduzido na América do Norte

(52 a 89%) (Paul *et al.* (2005a). Os valores da correlação entre a severidade e a severidade predita variaram de 0,69 a 0,93, também semelhante ao descrito por Paul *et al.* (2005a) (0,33 a 0,87), mas levemente superior.

Para que uma regressão seja útil na predição, o F calculado ( $F_{cal}$ ) por um modelo dever ser de 4-5x maior que o F crítico ( $F^*$ ) (Draper & Smith, 1981; Paul *et al.*, 2005a). Considerando os dados da Tabela 3, e um nível de significância de  $P = 0,05$ , um  $F^* = 4,18$  para o menor conjunto de dados ( $N = 32$ ) e  $F_{cal} = 84,7$ ; o  $F_{cal}$  foi 20x maior que  $F^*$ . Assim, o modelo complemento log-log tem precisão suficiente para prever a severidade a partir da incidência de giberela no sul do Brasil.

Xu *et al.* (2004) e Paul *et al.* (2005a) utilizaram dados de parcelas experimentais para modelar a relação *I-S* de giberela obtendo interceptos iguais a -2,313 e -1,728, respectivamente. Esses valores são superiores ao estimado no presente estudo (-2,756). Os mais altos valores de intercepto nos estudos anteriores podem estar relacionados aos dados serem originados de parcelas experimentais, onde, normalmente, a intensidade das epidemias são maiores que em campos comerciais.

Da mesma forma que Paul *et al.* (2005a), maiores intervalos de predição da severidade foram observados em incidências mais elevadas, no presente estudo, particularmente, quando a incidência de giberela foi maior que 40%. A relação entre a incidência da doença e precisão na estimativa da severidade a partir da incidência é discutida por Seem (1984). Em menores incidências ocorre menor variação na severidade, ou, de forma equivalente, existe grande proporcionalidade entre a incidência e a severidade. Com o aumento na incidência a amplitude de severidade para uma dada incidência também aumenta, levando a predições menos precisas da severidade a partir da incidência (Seem, 1984).



O nível de agregação da doença, dado pelo índice de dispersão ( $D$ ), e o número de unidades amostrais ( $N$ ) tiveram pouco efeito na precisão da predição da severidade pela incidência. De forma semelhante, Paul *et al.* (2005a) também não observaram efeito da amostragem e da heterogeneidade da doença na estimativa da severidade.

O padrão aleatório foi observado em 82% das lavouras de trigo amostradas na região Norte do Rio Grande do Sul. Assim, mantendo-se constante o número de espigas ( $n = 10$ ) por unidade amostral, levantamentos de campo no futuro podem utilizar uma amostragem de até 10 pontos de amostragem (10 espigas por ponto) por lavoura, mesmo em condições em que  $D = 3$ , com perda mínima na precisão da estimativa da severidade a partir da incidência.

Na China, uma incidência de 50% de giberela é adotada como limiar para definir uma condição de epidemia severa de giberela (Zhang *et al.*, 2013). Já nos Estados Unidos, o limiar adotado é a severidade de 10% (De Wolf *et al.*, 2003). Segundo o modelo da relação  $I-S$  proposto por Paul *et al.* (2005a), uma severidade média de 10% corresponde a uma incidência de 37% a 57%, fazendo com que os limiares nos dois países sejam similares.

Com o modelo da relação  $I-S$  proposto neste trabalho, utilizando a faixa de incidência de 47% a 57% a severidade correspondente variaria de 2,7% a 4,7%, ou seja, menos da metade do valor de severidade proposto para classificar situações de epidemia nos EUA.

As diferenças na relação  $I-S$  da giberela observadas no Brasil e nos Estados Unidos podem ser devidas às diferenças nos níveis de intensidade da doença dos dados utilizados no estudo de modelagem, os quais podem estar relacionados com diferenças no manejo de lavouras comerciais, especialmente com fungicidas, nível

de resistência das cultivares de trigo, condições climáticas, bem como diferenças no perfil populacional do patógeno.

Considerando a distribuição dos dados de incidência observados no levantamento das 160 lavouras de trigo no Norte do Rio Grande do Sul, a mediana da incidência (30%) poderia ser adotado como limiar preliminar de condição epidêmica nessa região em lavouras comerciais de trigo. Pelo modelo proposto, incidência de 30% corresponde a uma severidade estimada entre 2% e 3%.

Assim, o modelo de predição da severidade da giberela pela incidência pode ser útil em estudos futuros para avaliação de epidemias de giberela em larga escala.

## **4.2 Biologia e ecologia do patógeno: espécies e potencial toxigênico**

### **4.2.1 Resultados**

#### **4.2.1.1 Caracterização da população regional**

Um total de 455 isolados purificados foi obtido de espigas sintomáticas de lavouras localizadas em 37 municípios da região produtora na metade norte do Rio Grande do Sul. A maioria das identificações foram feitas pela técnica MLGT (Luminex) que permite identificar conjuntamente a espécie e o genótipo tricoteceno. Apenas nove isolados não produziram uma boa amplificação na análise MLGT e foram identificados quanto à espécie baseado na sequência do gene *TEF1- $\alpha$*  e o genótipo tricoteceno pela PCR.

Cinco espécies filogenéticas foram encontradas, sendo, em ordem de prevalência: *F. graminearum* (Fgra, 89,5%), *F. meridionale* (Fmer, 5,5%), *F. cortaderiae* (Fcor, 3,7%), *F. austroamericanum* (Faus, 0,66%) e *F. asiaticum* (Fasi,

0,66%). As espécies Fgra e Fmer estavam mais uniformemente distribuídas nas regiões amostradas (Figura 13). Já Fcor foi observada predominantemente na porção nordeste do RS em maiores altitudes (> 600 m) (Figura 13). Todos os isolados Fgra apresentaram o genótipo tricoteceno 15-ADON (Figura 13) e todos os isolados Fmer o genótipo NIV (Figura 13), exceto um isolado 15-ADON, para o qual a identificação foi repetida e confirmada após nova produção de micélio e extração de DNA. Todos os isolados Fasi apresentaram o genótipo NIV e, ambas as espécies Fcor e Faus, o genótipo NIV ou o 3-ADON (Figura 13); mais comumente, Fcor-NIV e Faus-3-ADON. Indiferente às espécies, 408 (89,7%) isolados apresentaram o genótipo 15-ADON, 41 (9,0%) dos isolados o genótipo NIV e seis isolados (1,3%) o genótipo 3-ADON, encontrado apenas no ano 2010.

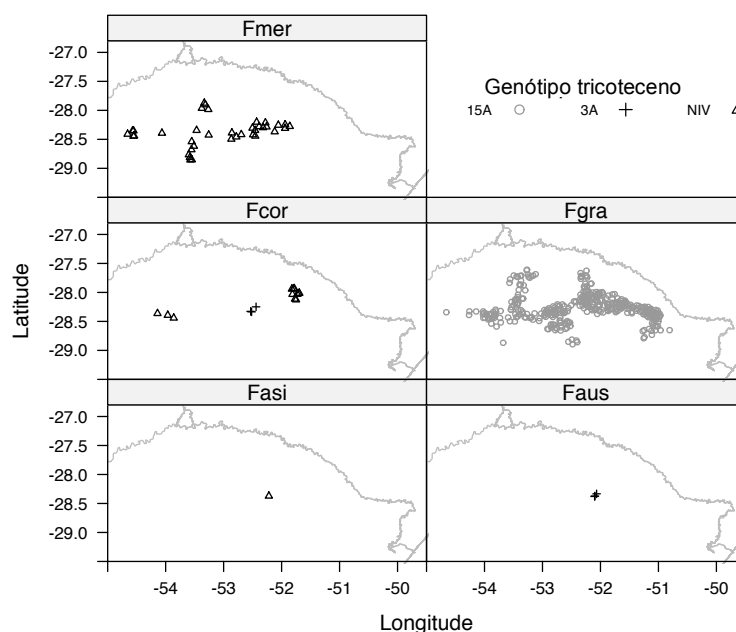


FIGURA 13. Número e localização geográfica de cinco espécies do complexo *Fusarium graminearum* (Fasi = *F. asiaticum*, Faus = *F. austroamericanum*, Fcor = *F. cortaderiae*, Fgra = *F. graminearum* e Fmer = *F. meridionale*) e seus respectivos genótipos tricotecenos [3-acetil(A)deoxinivalenol(DON), 15-ADON e nivalenol (NIV)] numa população regional de 455 isolados obtidos de espigas sintomáticas de trigo de lavouras no Rio Grande do Sul em três safras consecutivas (2009 a 2011).

Quando da comparação da frequência do genótipo 15-ADON com a frequência dos genótipos 3-ADON e NIV, agrupados, não se observou diferenças para lavouras com resteva de milho ou soja ( $\chi^2 = 1,50$ ;  $P = 0,22$ ) e para as duas classes de altitude do campo ( $\chi^2 = 1,48$ ;  $P = 0,23$ ) (Figura 14). No entanto, a frequência dos dois grupos de genótipos diferiu entre anos ( $\chi^2 = 10,51$ ;  $P = 0,01$ ), as duas classes de incidência da doença ( $\chi^2 = 4,27$ ;  $P = 0,03$ ) e estágio fenológico quando da avaliação ( $\chi^2 = 9,60$ ;  $P = 0,01$ ) (Figura 14).

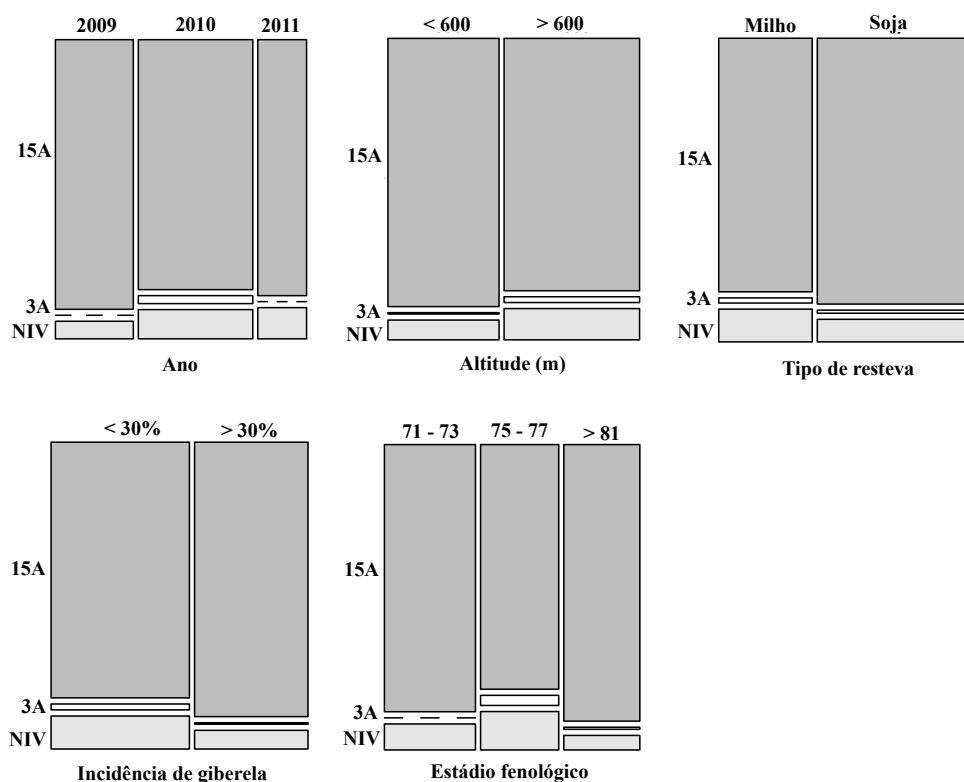


FIGURA 14. Gráficos de mosaico da frequência relativa de 455 isolados do complexo *Fusarium graminearum* com três genótipos tricothecenos [NIV=nivalenol, 3A= 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON), 15A= 15-ADON] agrupados por duas classes de altitude dos campos (m), cultura de resteva, duas classes de incidência de giberela e três estádios fenológicos da cultura no momento da amostragem.

#### **4.2.1.2 Caracterização de populações locais: saprofítica, aérea e patogênica**

Um total de 189 isolados foi obtido nas três áreas experimentais de trigo denominados: Santa Bárbara do Sul (SBA, n = 50 isolados), Marau (MAR, n = 79) e Vacaria (VAC, n = 60) (Tabela 5).

Dos isolados obtidos, 54 foram recuperados da resteva, 34 em placas de Petri com meio semi-seletivo durante o florescimento da cultura e 101 isolados recuperados de grãos giberelados, sendo que o conjunto desses isolados constituiu, respectivamente, a população saprofítica, atmosférica e patogênica (Tabela 5).

A incidência de giberela e de grãos giberelados foi distinta entre os campos, mas não foi observada diferença na severidade média de giberela (Tabela 5). A menor incidência de giberela foi observada em SBA em comparação aos campos de MAR e VAC (Tabela 5). A incidência de grãos giberelados, entretanto, foi maior em SBA e MAR quando comparados ao campo de VAC.

Nos três campos as micotoxinas DON e NIV foram detectadas nos grãos colhidos (Tabela 5). A concentração média de NIV entre os campos foi de 2,7 mg/kg e, portanto,  $\approx 5x$  maior que a concentração média de DON (0,5 mg/kg). Maiores diferenças na concentração de NIV/DON foram observadas nos campos de MAR e VAC onde a concentração média de NIV foi semelhante entre si e maior que a observada no campo de SBA (Tabela 5).

Quatro espécies foram encontradas nos campos SBA, MAR e VAC. As espécies encontradas estavam presentes nas três populações amostradas, exceto *Faus*, presente apenas na população patogênica (Tabela 6). Indiferente à área, *Fmer* foi a espécie mais frequente na população saprofítica, representando 50% dos isolados dessa população enquanto *Fgra* foi a espécie predominante na população

patogênica (84% dos isolados dessa população) (Tabela 6). A frequência de Fcor na população saprofítica e patogênica foi, respectivamente, 30% e 10%.

TABELA 5. Número de isolados por área e por população dentro de cada área, intensidade de giberela e concentração de micotoxinas da classe dos tricotecenos nos grãos colhidos, safra 2011.

Populações/variáveis	Local da área experimental			Soma/média
	Sta. Bárbara	Marau	Vacaria	
Nº de isolados				
Sapofítica (resíduo de milho)	17	20	17	54
Atmosférica (dossel da cultura)	6	19	9	34
Patogênica (grãos giberelados)	27	40	34	101
Soma	50	79	54	189
Intensidade de giberela (%) <sup>a</sup>				
Incidência <sup>a</sup>	14,8 ± 4,2	29,3 ± 11,8	24,7 ± 6,3	22,9
Severidade <sup>a</sup>	9,3 ± 3,4	6,7 ± 2,8	5,2 ± 2,4	7,1
Grãos giberelados <sup>a</sup>	1,7 ± 0,5	1,6 ± 0,4	0,7 ± 0,4	1,2
Micotoxina (mg/kg)				
Total de deoxinivalenol <sup>b</sup>	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,7	0,6 ± 0,1	0,5
Nivalenol	0,9 ± 0,8	2,5 ± 0,1	4,8 ± 2,0	2,7

<sup>a</sup>Dados médios agrupados para as duas cultivares de trigo (BRS Guamirim e Quartzo) utilizadas. Dados apresentados são as médias ± desvio padrão.

<sup>b</sup>Quantidade total de DON e suas formas acetiladas (3-ADON e 15-ADON).

De forma similar à análise da população regional, foi observado uma consistência entre a espécie e o genótipo tricoteceno nas populações locais: todos os isolados Fgra apresentaram o genótipo 15-ADON; todos isolados Fmer o genótipo NIV e isolados Fcor possuíram genótipo NIV ou 3-ADON, sendo NIV o genótipo mais abundante para Fcor. O único isolado Faus apresentou o genótipo 3-ADON.

Nas populações do campo, o genótipo NIV foi predominante (96,3%) na população saprofítica, os genótipos 15-ADON (67,6%) e NIV (32,4%) foram encontrados na população atmosférica. Finalmente, o genótipo tricoteceno 15-ADON foi dominante na população patogênica (84%) seguido pelo genótipo NIV (13,9%) e 3-ADON (2,1%) (Figura 15). Como esperado, a frequência dos genótipos diferiu nas populações dos campos (Figura 15).

TABELA 6. Número de isolados para cada espécie filogenética do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) em três populações amostradas em três áreas experimentais de trigo - Santa Bárbara do Sul, Marau e Vacaria, Rio Grande do Sul safra 2011.

População <sup>b</sup>	Espécie do CEFG <sup>a</sup>				Total
	Fgra	Fmer	Fcor	Faus	
Saprofítica	1	37	16	0	54
Atmosférica	23	6	5	0	34
Patogênica	85	5	10	1	101
Total	109	48	31	1	189

<sup>a</sup> Espécies do complexo *Fusarium graminearum* (O'Donnel *et al.*, 2004), onde, Fgra: *F. graminearum* sensu stricto, Fmer: *F. meridionale*, Fcor: *F. cortaderiae*, Faus: *F. austroamericanum*.

<sup>b</sup> Isolados obtidos de peritécios em colmos de milho, em placas de Petri com meio semi-seletivo posicionadas na altura do dossel da cultura durante a floração do trigo e isolados obtidos de grãos giberelados compuseram as populações saprofítica, atmosférica e patogênica, respectivamente.

Enquanto não houve diferença entre as frequências dos dois grupos de genótipos (15-ADON vs. NIV+3-ADON) nas populações atmosféricas e saprofíticas entre os campos (teste exato de Fischer,  $P \geq 0,41$ ), a frequência na população patogênica foi distinta. A frequência do grupo NIV+3-ADON na população patogênica foi de 4% em SBA e de 5% em MAR, enquanto que a frequência de NIV em VAC foi de 35%, o que contribuiu para uma frequência mais elevada do grupo NIV+3ADON nesse campo quando comparada a de SBA ( $P = 0,0001$ ) e MAR ( $P = 0,01$ ) (Figura 15).

No entanto, as frequências do genótipo 15-ADON comparadas às frequências dos grupos dos genótipos NIV+3-ADON entre as populações saprofíticas e patogênicas foi distinta independente o campo amostrado (SBA,  $\chi^2 = 36,13 / P = 0,0001$ ; MAR,  $\chi^2 = 46,37 / P = 0,0001$ ; VAC,  $\chi^2 = 15,39 / P = 0,001$ ).

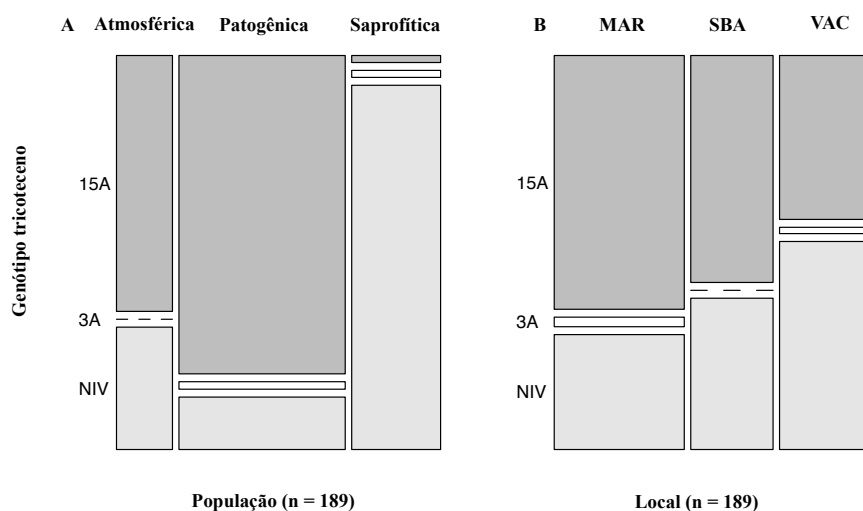


FIGURA 15. Gráficos de mosaico para a proporção dos genótipos tricotecenos 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON), 15-ADON e nivalenol (NIV). A) proporção dos genótipos nas populações das três áreas experimentais: população saprofítica a partir de colmos de milho coletados em torno de 30 dias antes do florescimento do trigo, população atmosférica pela coleta de esporos viáveis com uso de meio semi-seletivo durante a floração do trigo e população patogênica a partir de grãos giberelados. B) proporção dos genótipos nas três áreas experimentais: MAR = Marau; SBA = Santa Bárbara do Sul e VAC = Vacaria, indiferente às populações de cada área.

A análise de correspondência mostrou que a população saprofítica teve correspondência com o grupo NIV+3-ADON e que a população patogênica correspondeu ao genótipo 15-ADON (Figura 16). Além disto, as populações patogênicas de VAC e MAR foram mais relacionadas uma com a outra e ambas foram menos relacionadas à população patogênica de SBA (Figura 16).

As populações saprofítica e patogênica do campo de VAC foram mais relacionadas uma a outra (Figura 16) onde uma maior frequência de isolados Fcor, a maioria com genótipo NIV, foram encontradas nas populações saprofítica (88%) e patogênica (26%).

Nos campos SBA e MAR a frequência do grupo NIV+3-ADON foi sempre muito alta na população saprofítica (95-100%) e muito baixa na população patogênica (3-5%).



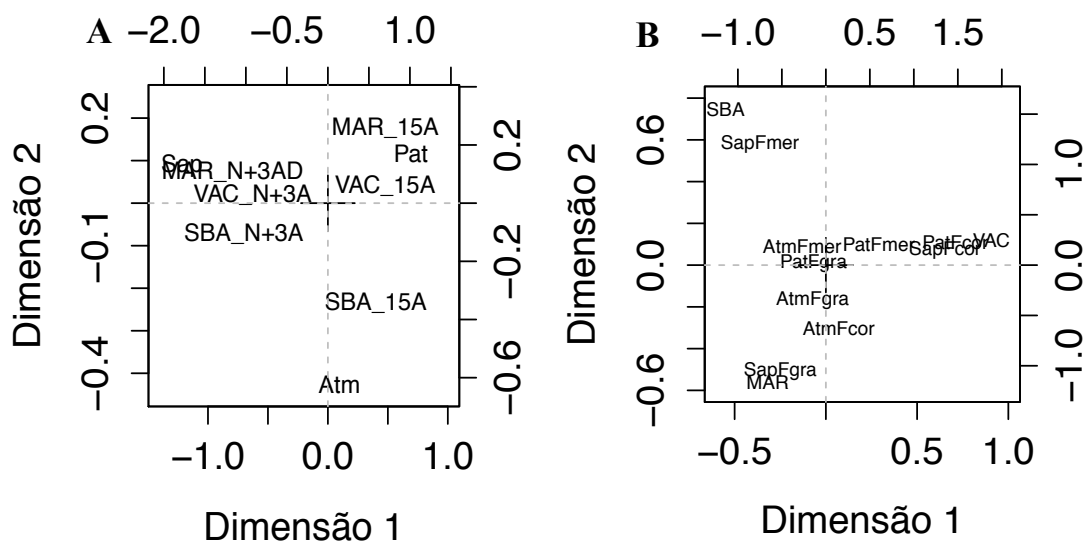


FIGURA 16. Biplots da análise de correspondência (A) entre as três áreas experimentais e a frequência dos genótipos em cada população e (B) entre a frequência de espécies do complexo *Fusarium graminearum* em cada população das três áreas amostradas. Populações saprofíticas (Sap), atmosférica (Atm) e patogênica (Pat). Isolados com genótipos 15-ADON (15A) ou a combinação de isolados nivalenol e 3-ADON (N+3A). Espécies do complexo: *Fusarium graminearum* sensu stricto (Fgra), *Fusarium meridionale* (Fmer) e *Fusarium cortaderiae* (Fcor).

#### 4.2.1.3 Ensaio de competitividade entre espécies

Sintomas de giberela foram observados em quase todas as espigas inoculadas (> 94% de incidência) de todas as cultivares, exceto da cultivar Sumai 3, a qual mostrou uma severidade média inferior a 1%. A severidade da giberela variou entre as outras três cultivares e a média da severidade foi correspondente ao nível de suscetibilidade à giberela (BRS 194=75%; Guamirim = 52% e Frontana = 44%). Similarmente, a incidência média de grãos giberelados foi de 74%, 57% e 48% para BRS 194, Guamirim e Frontana, respectivamente.

Um total de 39 isolados foram recuperados de grãos giberelados das cultivares, com exceção da cultivar Sumai 3, na qual não foram observados grãos giberelados. A frequência de recuperação de Fgra dos grãos infectados foi maior que a frequência de Fmer (Teste exato de Fisher;  $P = 0,028$ ) sendo que Fmer foi

recuperada apenas da cultivar BRS Guamirim, mas numa frequência também menor que Fgra (Figura 17).

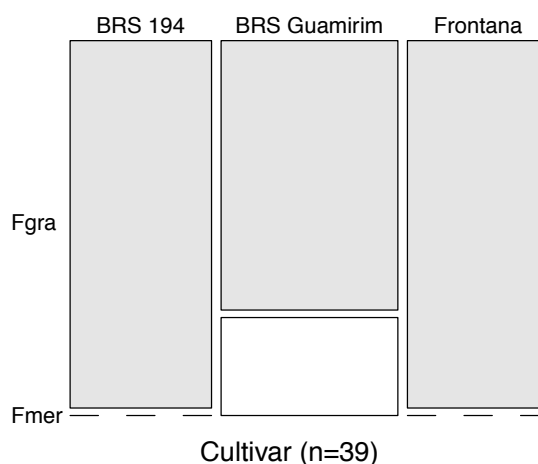


FIGURA 17. Proporção de isolados recuperados de *Fusarium graminearum* (Fgra) e *Fusarium meridionale* (Fmer) identificados por incompatibilidade vegetativa (zona de barragem) originários de plantas de trigo inoculadas na antese com uma mistura igual (1:1) de ambas as espécies em três cultivares de trigo com reações distintas à giberela: Frontana (resistente), BRS Guamirim (moderadamente resistente) e BRS 194 (suscetível). A significância do desvio em relação à distribuição esperada 1:1 foi testada pelo teste exato de Fisher ( $P = 0,028$ ).

#### 4.2.2 Discussão

Apesar de trabalhos similares terem sido realizados no Hemisfério Sul, pelo nosso conhecimento, este é o estudo mais amplo realizado até o momento sobre identificação e ecologia das espécies do CEEG com isolados exclusivamente do trigo. Levantamentos da composição do CEEG foram realizados no Uruguai (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013), Argentina (Ramirez *et al.*, 2007) e África do Sul (Boutigny *et al.*, 2011), onde respectivamente 151, 113 e 560 isolados foram obtidos de trigo/cevada/milho. No Brasil, estudos prévios utilizaram um número inferior de isolados ( $\leq 140$  isolados) provenientes também do Rio Grande do Sul e do Estado do Paraná (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2012).

A exemplo dos estudos realizados na América do Norte (Zeller *et al.*, 2004; Gale *et al.*, 2007; Schmale *et al.*, 2011), Europa (Waalwijk *et al.* 2003, Jennings *et al.* 2004, Tóth *et al.* 2005, Audenaert *et al.*, 2009) e América do Sul (Ramirez *et al.*, 2007, Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013) a espécie *Fgra* predomina em trigo no Sul do Brasil. Além de *Fgra* e *Fmer* anteriormente descritas em levantamentos em trigo no Brasil (Scoz *et al.*, 2009, Astolfi *et al.*, 2012), foram identificados isolados das espécies *Fasi* (n = 3), *Fcor* (n = 17) e *Faus* (n = 3), sendo essa última já relatada na cultura da cevada no Brasil (Astolfi *et al.*, 2011).

*F. asiaticum* é predominante em trigo em países asiáticos, onde apresenta os genótipos tricotecenos NIV ou 3-ADON (Gale *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008; Karugia *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Mudanças na frequência dos genótipos NIV e 3-ADON foram relatadas, com *Fasi* 3-ADON aumentando em frequência em relação ao *Fasi* NIV (Zhang *et al.*, 2010). De acordo com Zhang *et al.* (2012) isolados *Fasi* 3-ADON teriam vantagem adaptativa comparados a isolados NIV inferida pela maior taxa de crescimento micelial, maior fecundidade, maior acúmulo de tricoteceno e resistência a benzimidazol. No entanto, os três isolados *Fasi* coletados no Rio Grande do Sul apresentaram genótipo tricoteceno NIV, assim como os onze isolados *Fasi* identificados no Uruguai (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013).

No presente estudo e em trabalhos anteriores (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2012), a exemplo do que ocorre na China (Zhang *et al.*, 2012), todos os isolados *Fgra* tiveram genótipo tricoteceno 15-ADON, ao contrário do que ocorre na América do Norte (Ward *et al.*, 2008, Schmale *et al.*, 2011) e no Uruguai (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013), onde isolados *Fgra* com genótipo 3-ADON

também são observados, além de relatos raros do genótipo NIV em Fgra na América do Norte (Schmale *et al.*, 2011).

Ao longo dos três anos de amostragem e comparando com os relatos dos estudos anteriores com populações de 2006 no Brasil, até o momento não há evidência de mudanças na frequência das espécies ou dos genótipos tricotecenos, tal como descrito por Ward *et al.* (2008), em que isolados Fgra 15-ADON estariam sendo substituídos por isolados 3-ADON na América do Norte. Isolados Fgra 3-ADON teriam vantagem adaptativa sobre isolados 15-ADON, como maior agressividade e maior acúmulo de tricotecenos em grãos de trigo (Puri & Zhong, 2010).

Pela proximidade geográfica de áreas com presença de isolados Fgra 3-ADON (Uruguai), deve-se considerar o risco da introdução de isolados Fgra 3-ADON no Brasil, ainda não detectado.

Zhang *et al.* (2012) indica que, talvez, a preferência por hospedeiro e a área cultivada com diferentes cultivos influencie na distribuição das espécies do complexo. Na Ásia, isolados Fasi predominaram em levantamentos realizados em lavouras de arroz e a frequência de Fasi parece estar associada com a área coberta pelas lavouras de arroz na região (Zhang *et al.*, 2012). Na região de Huanghuaihai, onde milho-trigo domina a paisagem e a área com arroz é inferior a 7%, isolados Fasi são raros. Da mesma forma, em Luxemburgo, Pasquali *et al.* (2010) observaram que a frequência do genótipo NIV (*F. culmorum* + *F. graminearum*) foi maior em locais com resteva de milho.

Quanto aos fatores que podem influenciar na ocorrência das espécies/genótipos tricotecenos, não houve evidência do efeito da resteva, seja ela milho ou soja. No Rio Grande do Sul o predomínio do plantio direto e o transporte

atmosférico de propágulos de *F. graminearum* a longas distâncias (Schmale *et al.*, 2012), pode favorecer a disseminação e manutenção do inóculo ao longo de toda safra (Del Ponte *et al.*, 2005), minimizando o efeito do inóculo local na distribuição das espécies, comportamento este análogo ao efeito do inóculo local na intensidade das epidemias e no padrão espacial da doença.

Também não houve evidência do efeito da altitude na frequência dos genótipos tricotecenos, com predomínio de 15-ADON indiferente à altitude do campo amostrado. A altitude vem sendo utilizada para descrever o possível efeito da temperatura do ar na distribuição das espécies do CEEG (Qu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Zhang *et al.* (2012) não observaram influência da temperatura na distribuição de Fgra e Fasi em trigo na China, de maneira similar ao observado por Zhang *et al.* (2010) em cevada na mesma região. Assim, a altitude não parece ser um fator crítico na distribuição das espécies. A variação térmica diária pode explicar a ausência do efeito da altitude na frequência dos genótipos tricotecenos. Spolti *et al.* (2012) relatam maior crescimento micelial de Fgra em relação a Fmer a 25°C mas não houve diferença no crescimento micelial dessas espécies nas temperaturas de 10°C a 20°C.

Espécies mais agressivas têm vantagem na competição interespecífica quando ocorre limitação de recursos do hospedeiro (Zhan & McDonald, 2013). Assim, em anos menos favoráveis às epidemias, em condições de menor intensidade da doença e nos estádios iniciais da epidemia a competição interespecífica é teoricamente menor, favorecendo espécies menos agressivas.

A frequência de isolados NIV+3-ADON, genótipos referentes a espécies menos agressivas (Fmer, Fcor, Fasi ou Faus) em trigo em comparação a Fgra (Goswami & Kistler, 2005; Spolti *et al.*, 2012), foi maior no ano de 2011,

caracterizado como não epidêmico no Sul do Brasil (Fernandes & Nicolau, 2013), em situações de menor intensidade de giberela (incidência < 30%) e nos estádios mais iniciais do desenvolvimento dos grãos. Isso pode explicar em parte a variação temporal e espacial da frequência de tais espécies.

Em três áreas experimentais de trigo no Rio Grande do Sul, semeados sobre resteva de milho foi observado padrão semelhante descrito por Boutigny *et al.* (2011), com uma variação drástica na frequência das espécies de acordo com o sítio amostrado. Na resteva de milho houve o predomínio de espécies com genótipo NIV (> 95%) correspondendo a isolados Fmer e Fcor. Mas nas espigas de trigo, houve predomínio do genótipo 15-ADON, correspondente a isolados da espécie Fgra. Da mesma forma, os resultados do estudo de competitividade de Fgra e Fmer nas espigas de trigo de diferentes cultivares mostram que Fgra 15-ADON possuem vantagem competitiva sob isolados Fmer NIV, indiferente ao nível de resistência da cultivar.

Em conjunto, os dados do levantamento regional, a frequência das espécies nas três áreas experimentais intensamente amostradas e o estudo de competitividade indicam que a preferência por hospedeiro entre as espécies do CEFG, como sugerido por Boutigny *et al.* (2011), é provavelmente regulada por diferenças na habilidade competitiva na infecção do hospedeiro. Diferenças na agressividade das espécies Fmer e Fgra em trigo (Spolti *et al.*, 2012) e milho (Kuhnem *et al.*, 2013) reforçam tal hipótese.

Boutigny *et al.* (2013) analisando um total de 294 isolados membros do CEFG amostrados na França, sendo 19 de cevada, 90 de trigo e 185 de milho, não observaram diferença na frequência de isolados NIV entre grãos de trigo e milho,

mas a frequência de Fgra foi de 97% e apenas três isolados Fboo foram encontrados em milho.

Os nossos resultados e os resultados de Boutigny *et al.* (2011) e Boutigny *et al.* (2013) sugerem que a preferência por hospedeiro está associada à espécie filogenética e não ao genótipo tricoteceno do isolado. Tal hipótese deve ser testada, pois pode ser uma evidência de especiação ecológica.

A contaminação simultânea de DON e NIV em grãos de trigo (Del Ponte *et al.*, 2012) como o observado neste estudo nas áreas de SBA, MAR e VAC, principalmente nestes dois últimos, pode representar risco adicional à saúde pública, uma vez que a combinação de NIV e DON tem efeito sinérgico na toxicidade (Thuvander *et al.*, 1999).

Apesar do predomínio de Fgra, a ocorrência de espécies simpátricas do CEFG com genótipo tricoteceno distintos, assim como citado por Umpiérrez-Failache *et al.* (2013) no Uruguai, reforça a necessidade de monitoramento de NIV em trigo no Rio Grande do Sul. Além da composição da população patogênica, outros fatores podem estar associados à co-ocorrência de DON e NIV nos grãos, como o dano distinto nos grãos causado pelas espécies do CEFG predominantes em trigo no sul do Brasil (Spolti *et al.*, 2013b) e a ocorrência de grãos infectados mas assintomáticos e que podem estar contaminados com micotoxinas (Cowger & Arrellano, 2010).

### **4.3 Caracterização de *fitness* de isolados norte-americanos com distinto potencial toxigênico**

#### **4.3.1 Resultados**

##### **4.3.1.1 Caracterização saprofítica**

A taxa de crescimento micelial ( $P \geq 0,203$ ) e a sensibilidade à temperatura ( $P = 0,065$ ) não diferiu entre os dois grupos de genótipos tricotecenos (Tabela 7).

Indiferente ao substrato de cultivo, houve uma alta variação entre os isolados de cada grupo de genótipo tricoteceno na capacidade de formar peritécio. Apenas dois isolados (693NY11 e 600NY11) não produziram peritécio em ambos os substratos.

A maioria dos isolados 15-ADON, em meio de cenoura, iniciaram mais cedo a formação de peritécios e em maior abundância do que isolados 3-ADON, diferença essa não observada quando do cultivo em colmo de milho, onde foi observada menor produção de peritécio, comparada ao meio de cenoura (Figura 18).

Apesar de terem formado peritécios de forma mais lenta em meio de cenoura, os isolados 3-ADON produziram duas vezes mais ascósporos que os isolados 15-ADON ( $P = 0,041$ ). Tal diferença não foi observada na média de UFC originárias dos ascósporos produzidos em colmos de milho ( $P = 0,729$ ) (Tabela 7).



TABELA 7. Caracteres relacionados ao *fitness* saprofítico de 50 isolados de *Fusarium graminearum* causando giberela em trigo no estado de Nova York na safra 2011, possuindo genótipo tricoteceno 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON) ou 15-ADON.

Vavriável	Genótipo tricoteceno <sup>a</sup>		P <sup>b</sup>
	15-ADON	3-ADON	
Temperatura – crescimento micelial <sup>c</sup>			
15°C	3,25 ± 1,3	2,61 ± 1,5	0,345
20°C	8,76 ± 2,5	9,30 ± 1,9	0,471
25°C	11,75 ± 1,9	11,73 ± 1,9	0,573
30°C	9,37 ± 4,1	10,53 ± 3,4	0,203
Sensibilidade a temperatura <sup>d</sup>	3,27 ± 1,4	3,75 ± 1,2	0,065
Liberação de ascósporos <sup>e</sup>			
Meio de cenoura (ascósporos/mm <sup>2</sup> ) <sup>f</sup>	187,7 ± 122,9	439,4 ± 438,3	0,041
Colmos de milho (UFC/placa) <sup>g</sup>	36,1 ± 34,4	41,3 ± 30,8	0,729

<sup>a</sup> Os isolados foram identificados de acordo com o genótipo tricoteceno com PCR pela amplificação dos genes *Tri3* e *Tri12* (Schmale *et al.*, 2011). Um total de 25 isolados 15-ADON e 25 isolados 3-ADON foram usados neste estudo. Dados apresentados são as médias ± desvio padrão. <sup>b</sup> A significância na comparação entre os genótipos tricotecenos foi estimada com uso de teste de permutação. <sup>c</sup> Determinado em BDA no quinto dia de incubação. <sup>d</sup> A razão no crescimento micelial a 30°C e 15°C em BDA no quinto dia após a incubação. <sup>e</sup> Ascósporos produzidos em meio de cenoura ou em colmo esterilizados de milho. <sup>f</sup> Contagem de ascósporos a partir do meio de cenoura. <sup>g</sup> Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) em ágar-água a partir da liberação de ascósporos produzidos em colmos de milho inoculados.

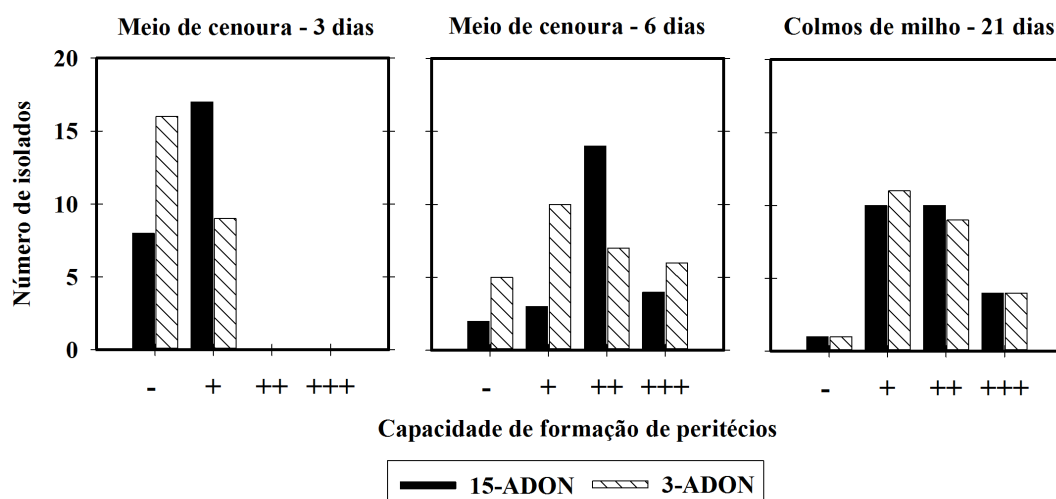


FIGURA 18. Capacidade de formação de peritécios por isolados de *Fusarium graminearum* (n = 50) possuindo genótipo tricoteceno 3-ADON ou 15-ADON. Classificação da capacidade de formar peritécios estimada por notas, onde: - = não formou peritécio, +, ++ e +++ igual a 1% - 10%; 11% - 30% e > 30% da área coberta com peritécios, respectivamente. Avaliações em meio de cenoura após três ou seis dias à retirada do micélio das placas ou em colmos de milho 21 dias após à inoculação. Dados de um experimento que representam o resultado dos dois experimentos conduzidos.

### 4.3.1.2 Agressividade e produção de tricotecenos

Todos os isolados infectaram as espigas de trigo da cultivar Norm mas a agressividade dos mesmos, medida por duas variáveis associadas à doença (severidade e incidência de grãos giberelados) e duas variáveis relacionadas ao rendimento (peso de mil grãos e dano relativo), variaram consideravelmente e foram significativamente distintas entre os isolados de um mesmo genótipo tricoteceno, mas sem diferença entre os dois grupos genotípicos (Tabela 8). Isolados com agressividade baixa ou alta foram encontrados em ambos os genótipos tricotecenos (Figura 19 e Figura 20). A maior proporção de espiguetas gibereladas foi observada na porção abaixo da espiguetas inoculada ( $P = 0,023$ ), indiferente ao genótipo tricoteceno ( $P = 0,928$ ).

TABELA 8. Caracterização patogênica de 50 isolados de *Fusarium graminearum* causando giberela em trigo no estado de Nova York em 2011, possuindo genótipo tricoteceno 3-acetil(A)deoxinivalenol(DON) ou 15-ADON.

Variáveis <sup>b</sup>	Genótipo tricoteceno <sup>a</sup>	
	15-ADON	3-ADON
Severidade (%) <sup>c</sup>	39,3 ± 9,1	40,4 ± 9,6
Grãos giberelados (%) <sup>d</sup>	54,7 ± 15,0	53,9 ± 13,8
Peso de mil grãos (g) <sup>e</sup>	14,0 ± 1,8	13,0 ± 1,6
Dano relativo (%) <sup>f</sup>	47,4 ± 7,0	47,2 ± 6,0
Deoxinivalenol (µg /g) <sup>g</sup>	41,4 ± 15,7	71,1 ± 26,9
15-acetildeoxinivalenol (µg /g) <sup>g</sup>	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1
3-acetildeoxinivalenol (µg /g) <sup>g</sup>	0,5 ± 0,2	1,2 ± 0,4
Total de tricotecenos (µg /g) <sup>h</sup>	42,7 ± 16,2	73,1 ± 27,4

<sup>a</sup> Os isolados foram identificados de acordo com o genótipo tricoteceno com PCR pela amplificação dos genes *Tri3* e *Tri12* (Schmale *et al.*, 2011). Um total de 50 isolados, sendo 25 isolados 15-ADON e 25 isolados 3-ADON foram usados neste estudo. Os dados são as médias ± intervalo de confiança (IC 95%). <sup>b</sup> Intensidade de giberela em plantas da cultivar Norm inoculadas pelo método de inoculação da espiguetas central. <sup>c</sup> Proporção de espiguetas gibereladas em espigas 10 dias após a inoculação pelo método de inoculação da espiguetas central. <sup>d</sup> Determinados com base em avaliação visual. <sup>e</sup> Peso de mil grãos (g). <sup>f</sup> Diferença relativa no peso de grãos das plantas não inoculadas e inoculadas. <sup>g</sup> Concentração média de tricotecenos nos grãos das espigas de 'Norm' inoculadas em casa de vegetação; ppm = parte por milhão (µg/g das amostras). <sup>h</sup> Concentração média de tricotecenos (DON + 15-ADON + 3-ADON) nos grãos das espigas de 'Norm' inoculadas em casa de vegetação.

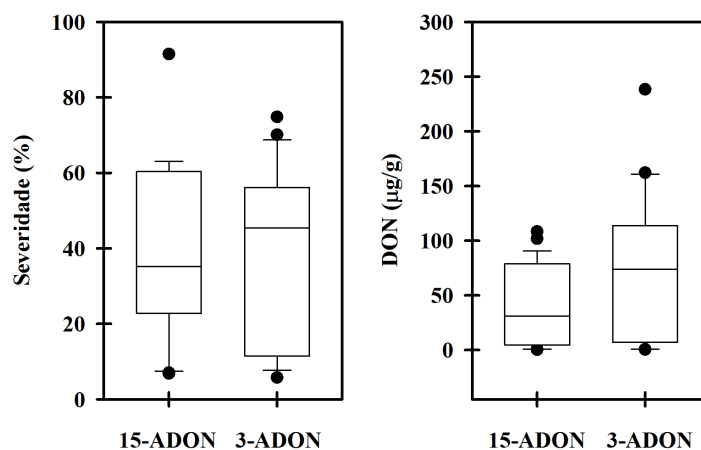


FIGURA 19. Distribuição dos valores de severidade de giberela (A) e da concentração de deoxinivalenol (B) para um conjunto de 25 isolados de *Fusarium graminearum* de cada genótipo tricoteceno (15-ADON e 3-ADON) inoculados pelo método de inoculação da espiguetta central em plantas da cultivar de trigo Norm. A linha dentro das caixas representa a mediana, enquanto que as linhas superiores e inferiores das caixas representam os *quartis* de 75% e 25% dos dados, respectivamente. As barras verticais além das caixas representam os *quartis* de 10% e 90% dos dados, e os círculos fechados indicam os valores discrepantes.

Não foi detectada diferença na média de DON entre os dois genótipos tricotecenos (Tabela 8). Dez e seis isolados 15-ADON e 3-ADON, respectivamente, não produziram níveis detectáveis de uma das formas acetiladas de DON. Os isolados com genótipo 15-ADON produziram uma concentração maior de 15-ADON do que isolados com genótipo 3-ADON. O mesmo padrão foi observado para os isolados com genótipo 3-ADON que produziram mais 3-ADON do que os isolados com genótipo 15-ADON (Tabela 8). Não foi encontrada diferença entre os dois genótipos tricotecenos na produção total de tricotecenos (DON + 15-ADON + 3-ADON) (Tabela 8).

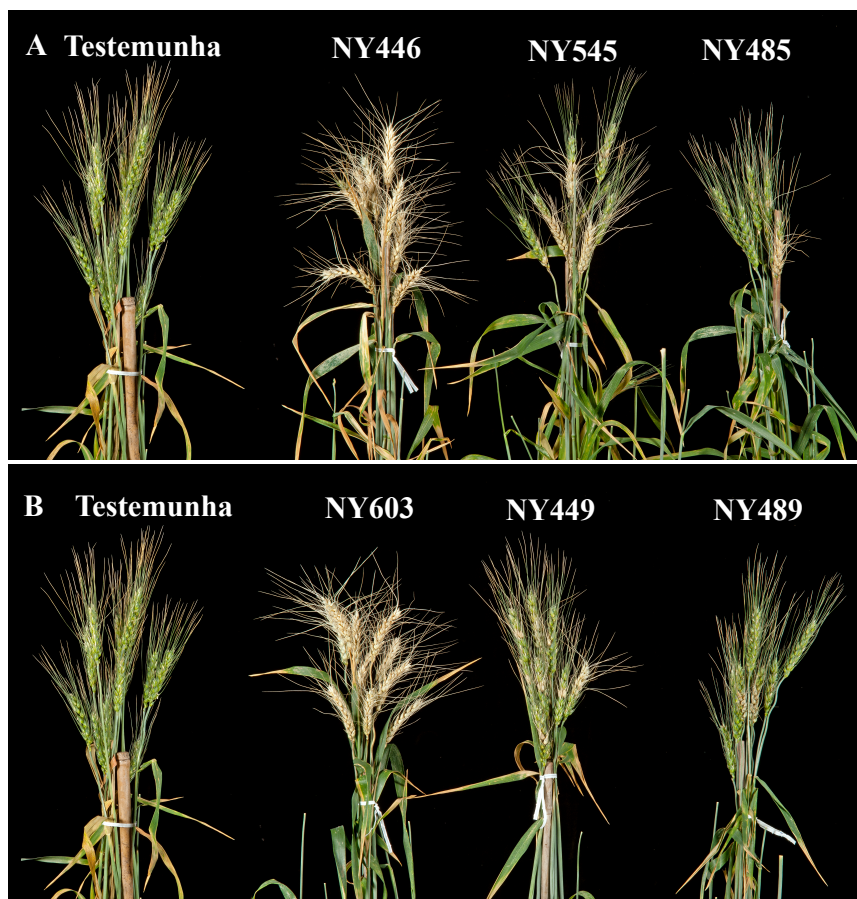


FIGURA 20. Variação na agressividade de seis isolados de *Fusarium graminearum* com os genótipos tricotecenos 15-ADON (A) e 3-ADON (B) inoculados em plantas de trigo da cultivar Norm.

Todos os isolados produziram DON nos grãos maduros, com concentração variando de 0,25  $\mu\text{g/g}$  a 238,30  $\mu\text{g/g}$ . A concentração de DON foi muito maior que a concentração das formas acetiladas (Tabela 8), sendo a concentração máxima de 3,4  $\mu\text{g/g}$  das formas acetiladas produzida por um isolado 3-ADON (Figura 21).

Dois isolados 15-ADON produziram 3-ADON mas não produziram 15-ADON, e um isolado 15-ADON produziu 2x mais 3-ADON que 15-ADON (Figura 21). Para o grupo de isolados 3-ADON, apenas quatro isolados produziram níveis detectáveis de 15-ADON e todos, exceto um, produziram mais 3-ADON que 15-ADON.

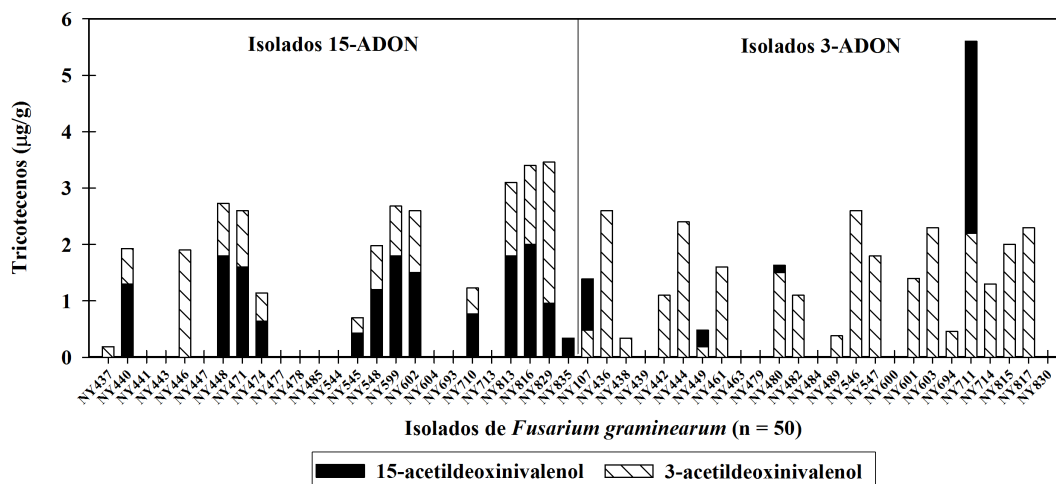


FIGURA 21. Concentração média de 15-acetil(A)deoxinivalenol(DON) e 3-ADON produzida por 25 isolados de *Fusarium graminearum* com genótipo tricoteceno 15-ADON ou 3-ADON.

Dos 50 isolados, houve inconsistência entre a genotipagem (PCR) e o quimiotipo (GC-MS) para cinco isolados. Três isolados com genótipo 15-ADON foram determinados como do quimiotipo 3-ADON e dois isolados de genótipo 3-ADON foram do quimiotipo 15-ADON. Assim, os dados foram reanalisados reagrupando-se os isolados de acordo com o grupo do quimiotipo (26 3-ADON vs. 24 15-ADON) e os resultados não diferiram de quando os isolados foram agrupados pela análise molecular (25 3-ADON e 25 15-ADON). Portanto, os genótipos tricotecenos foram mantidos nas Figuras e nas Tabelas.

#### 4.3.1.3 *Fitness* geral dos genótipos tricotecenos

Análise de correlação de cada pareamento ( $n = 91$ ) para as 14 variáveis citadas anteriormente mostraram significância ( $P < 0,05$ ) em 49 correlações. Dentre as variáveis da caracterização saprofítica, a taxa de crescimento micelial foi positivamente correlacionada com a produção de ascósporos em colmos de milho ( $P = 0,01$ ) mas não em meio de cenoura ( $P = 0,21$ ). Os valores mais altos de

correlação foram encontrados entre as medidas que decreveram características patogências, especialmente a severidade da doença que foi altamente correlacionada com as variáveis de rendimento e com a quantidade total de tricotecenos ( $P < 0,01$ ) (dados não apresentados).

Na análise de componentes principais, a produção de ascósporos em colmos de milho, a quantidade total de tricotecenos em grãos de trigo e a severidade de giberela na espiguetas acima do ponto de inoculação mostraram os maiores valores de correlação com o primeiro, segundo e terceiro eixos, respectivamente (Figura 22).

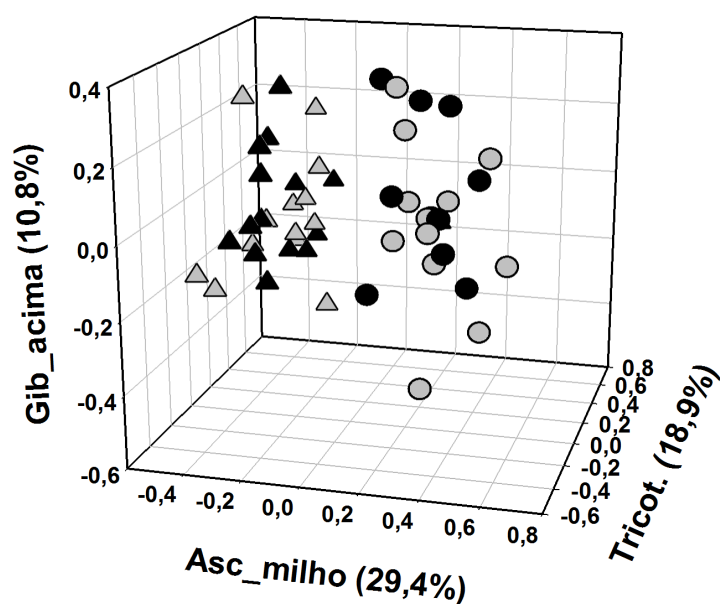


FIGURA 22. Ordenação dos 50 isolados de *F. graminearum*. Os símbolos identificam os grupos encontrados pela análise de agrupamento. Primeiro componente Asc\_milho, contagem de UFC em ágar-água liberados a partir de colmos de milho inoculados; segundo componente Tricot., somatório da concentração dos tricotecenos DON+15ADON+3ADON; terceiro componente Gib\_acima, severidade de giberela acima do ponto de inoculação (espiguetas centrais) em plantas da cultivar de trigo Norm. Círculo: grupo 1; triângulo: grupo 2. Preto: isolados 15-ADON isolates; cinza: isolados 3-ADON.

Os três primeiros componentes principais explicaram em conjunto 59,1% da variação total entre os isolados. Os autovetores dos três componentes principais (produção de ascósporos em colmos de milho, a quantidade total de tricotecenos em grãos de trigo e a severidade de giberela acima do ponto de inoculação) explicaram 29,4%, 18,9%, e 10,8% da variação, respectivamente.

Na análise de agrupamento, dois grupos nítidos foram formados ( $P \geq 0,350$ ), com 27 e 23 isolados cada (Figura 22). Em conjunto, as análises mostraram que isolados dos dois genótipos tricotecenos estavam presentes em ambos os grupos e em proporção similar (15-ADON/3-ADON: 14/13; 11/12) (Figura 22). O mesmo é válido quando os indivíduos foram classificados de acordo com o quimiotipo pela análise química (15-ADON/3-ADON: 13/14; 12/11).

#### 4.3.2 Discussão

No presente estudo, populações dos genótipos 3-ADON e 15-ADON não puderam ser diferenciadas pela maioria das características do *fitness* saprofítico ou patogênico. A produção de ascósporos em meio de cenoura foi maior entre isolados 3-ADON, mas isto não foi observado em colmos de milho, um substrato ‘natural’.

O crescimento micelial não diferiu entre os genótipos em nenhuma das temperaturas testadas. A sensibilidade à temperatura vem sendo proposta como uma variável para avaliar a adaptação térmica (Zhan & McDonald, 2011) e o *fitness* saprofítico (Tunali *et al.*, 2012). A flutuação anual nas frequências dos genótipos 3-ADON e 15-ADON foi associada à variação sazonal na temperatura (Gilbert *et al.*, 2012). Usando uma mistura de isolados 3-ADON:15-ADON (1:1) inoculada por aspersão em trigo, uma maior proporção de isolados 3-ADON foi recuperada em plantas inoculadas e incubadas a 28°C que a 20°C (Gilbert *et al.*, 2012). De maneira

similar, uma maior quantidade de DNA de isolados 3-ADON foi encontrado em cevada inoculada em temperaturas mais elevadas (Clear *et al.*, 2013).

No entanto, em nosso estudo não se observou evidência de diferenças na sensibilidade à temperatura entre isolados 3-ADON e 15-ADON. Mais estudos são necessários para testar a hipótese de que isolados 3-ADON tem alguma vantagem adaptativa em temperaturas mais elevadas.

Os isolados 15-ADON formaram peritécios em meio de cenoura mais rapidamente que isolados 3-ADON, mas uma grande variabilidade foi encontrada entre os isolados na capacidade de formar peritécios e de produzir ascósporos, assim como em outros estudos (Chen & Zhou, 2009; Fuentes-Bueno, 2012).

Diferenças na maturação dos peritécios foi considerada uma das fontes de erro na quantificação da produção de ascósporos (Fuentes-Bueno, 2012), o que pode explicar a diferença nesta característica entre os dois genótipos tricotecenos em nosso estudo em meio de cenoura. No entanto, tal diferença não foi observada quando colmos de milho foram utilizados como um substrato. Apesar do uso tradicional do meio de cenoura como substrato para os estudos de fertilidade sexual em *F. graminearum* (Trail & Common, 2000; Trail *et al.*, 2002; Fuentes-Bueno, 2012; Fan *et al.*, 2013), a formação de peritécios em colmos de milho, uma fonte comum de inóculo para as epidemias de giberela (Sutton, 1982; Fernando *et al.*, 1997; Dill-Macky & Jones, 2000; Keller *et al.*, 2010), pode levar, talvez, a resultados de maior relevância pra a epidemiologia da doença.

A agressividade de isolados de *F. graminearum* vem sendo positivamente correlacionada com a sua capacidade de produzir DON (Mesterházy, 2002). Os isolados utilizados neste estudo variaram na sua capacidade de produzir tricotecenos e na agressividade em uma cultivar suscetível de trigo, mas os grupos



de genótipos não puderam ser diferenciados por estas características, de forma similar aos resultados encontrados por Foroud *et al.* (2012). Similarmente, Purahong *et al.* (2013) reportaram uma grande variação na agressividade entre 32 isolados de *F. graminearum* obtidos de trigo na Itália e não observaram diferença na agressividade entre os três quimiotipos avaliados (15-ADON, 3-ADON e NIV).

Neste estudo, nove isolados entre os 12 que mais produziram DON foram do genótipo 3-ADON. No entanto, não foi observada diferença entre os dois genótipos tricotecenos quanto a produção de DON, o que concorda com resultados de Gale *et al.* (2009) com populações do patógeno do estado americano de Minnesota.

Como esperado, os isolados produziram maiores quantidades do tricoteceno correspondente ao genótipo tricoteceno. No entanto, isolados do genótipo 15-ADON produziram níveis detectáveis da micotoxina 3-ADON em alguns casos igual ou maior que a micotoxina 15-ADON, demonstrando inconsistência entre o método molecular e o químico.

Estudos prévios realizados para elucidar a base genética da produção destas duas formas acetiladas de DON por isolados *F. graminearum*, revelaram que a produção de 3-ADON em substrato sólido por isolados do genótipo 15-ADON parece ser regulado pelo gene *Tri101*, e não pelo gene *Tri3*, o qual parece regular a produção da micotoxina 15-ADON pelo genótipo 3-ADON, especialmente pela acetilação de DON pelo gene *Tri3* (Garvey *et al.*, 2009; Alexander *et al.*, 2011).

Em função de DON ser um substrato pobre para a ação do gene *Tri3*, apenas traços de 15-ADON dever ser esperados em substratos sólidos inoculados com isolados 3-ADON (Alexander *et al.*, 2011), o que foi o caso do nosso estudo.

Discrepância similar entre o genótipo e o fenótipo na produção potencial de micotoxinas por *F. graminearum* também foi observada por Mugrabi de Kupler *et al.* (2011) onde um “quimiotipo molecular” (aqui, o genótipo tricoteceno) foi capaz de produzir micotoxinas de outro quimiotipo em quantidades consideráveis.

Várias medidas do *fitness* estavam significativamente correlacionadas, algumas dessas já esperadas baseado no fato que derivaram umas de outras (ex.: peso de mil grãos e dano relativo) ou com base em relatos prévios. Todas as variáveis relacionadas à patogenicidade foram correlacionadas com o total de tricotecenos nos grãos de trigo, especialmente com a severidade da doença, o que pode estar associado com o papel do DON como um fator de virulência (Proctor *et al.*, 1995; Ilgen *et al.*, 2009) e ao fato de que espigas com mais alta severidade da doença poderiam apresentar maior massa fúngica, levando então a níveis mais elevados de DON. A incidência de grãos giberelados foi altamente correlacionado com a concentração de DON em estudos anteriores (Paul *et al.*, 2005b; Cowger & Arellano, 2010).

Dentre as medidas do *fitness* saprofítico, a significância da correlação entre o crescimento micelial em BDA com a produção de ascósporos em colmo de milho sugere que colmos de milho podem ser uma escolha mais relevante que meio de cenoura como substrato em estudos da biologia do patógeno e da epidemiologia da doença (Keller *et al.*, 2010).

O uso da análise multivariada, até onde se sabe, aqui usada pela primeira vez para determinar o *fitness* de isolados *F. graminearum* com distintos genótipos tricotecenos, não mostrou evidência de uma diferença entre as duas populações pois os dois grupos nítidos formados foram compostos por indivíduos de ambos os genótipos tricotecenos em proporções semelhantes.

Previamente, Tunali *et al.* (2012) utilizaram análise de componentes principais para avaliar o *fitness* de 30 isolados de três espécies (*F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. pseudograminearum*) associadas com giberela e podridão da raiz em trigo na Austrália baseado em 13 características saprofíticas e patogênicas; estas espécies não puderam ser diferenciadas e os autores não informaram o genótipo tricoteceno ou o quimiotipo dos 10 isolados de *F. graminearum* utilizados.

Da mesma forma, Talas *et al.* (2012), estudando a diversidade genética de 90 isolados de *F. graminearum* originários de três campos distintos de trigo (30 isolados/campo), delinearam quatro grupos distintos de isolados, mas novamente, os autores não informaram o genótipo tricoteceno dos isolados.

De acordo com Ward *et al.* (2008) existe uma contribuição dos isolados 3-ADON ao genoma dos isolados 15-ADON. Cruzamento sexual entre e dentro os quimiotipos podem ocorrer no campo (Chen & Zhou, 2009) e em condições de laboratório (Fuentes-Bueno, 2012).

Uma hipótese é que, inicialmente, imigrantes com genótipo 3-ADON poderiam possuir genes que confeririam um *fitness* superior aos antecedentes com genótipo 15-ADON numa região. Mas através das gerações e pela recombinação e seleção natural, aqueles genes introduzidos poderiam estar agora presentes em ambos os genótipos tricotecenos.

A proporção dos genótipos tricotecenos 85% 15-ADON: 15% 3-ADON encontrados em levantamento no oeste de Nova York em trigo em 2007 (Schmale *et al.*, 2011) é idêntico à proporção encontrada na mesma região em 2011 (G. C. Bergstrom, dados não publicados).

Assim, parece não haver uma mudança significativa na frequência dos genótipos tricotecenos no oeste de Nova York e isto é consistente com os resultados

descritos neste estudo em que não existe uma distinção clara nos atributos do *fitness* de isolados 3-ADON e 15-ADON.

No entanto, a grande variação em atributos específicos do *fitness* entre populações regionais de *F. graminearum* sugere que mais pesquisas são necessárias no futuro para entender como estas características podem estar relacionadas com a história de vida do fungo e como isto pode levar a novos conhecimentos para favorecer o manejo da doença.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

O inóculo de *Fusarium graminearum* presente dentro da lavoura não tem efeito na intensidade de giberela e na distribuição espacial da doença em ambientes com predomínio do sistema plantio direto na Região Norte e Nordeste do Rio Grande do Sul.

O padrão espacial de giberela, em sua maioria aleatório, concordando com estudos no hemisfério norte e zonas temperadas, não foi influenciado pela intensidade das epidemias, demonstrando o comportamento monocíclico da doença e contribuição de inóculo aéreo de múltiplas fontes (dentre e fora do campo) que é depositado aleatoriamente no cultivo.

O complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) associado à giberela em trigo no Estado do Rio Grande do Sul apresenta grande diversidade, com a co-ocorrência de espécies com potencial toxigênico distintos.

A frequência das espécies do CEFG em trigo é influenciada pela competição interespecífica onde a preferência por hospedeiro entre os membros do CEFG é regulada por diferenças na habilidade patogênica.

Isolados 3-ADON não apresentam vantagem adaptativa evidente sobre isolados 15-ADON, em atributos do *fitness* saprofítico ou patogênico, de populações contemporâneas de *F. graminearum* de trigo no estado americano de Nova York.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUDENAERT, K. et al. Mycotoxin glucosylation in commercial wheat varieties: Impact on resistance to *Fusarium graminearum* under laboratory and field conditions. **Food Control**, Philadelphia, v. 34, p. 756-762, 2013.

AKINSANMI, O. A. et al. Passage through alternative hosts changes the fitness of *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. **Environmental Microbiology**, London, v. 9, p. 512-520, 2007.

ALEXANDER, N. J. et al. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 48, p. 485-495, 2011.

ALVAREZ, C. L. et al. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. **Toxins**, Basel, v. 3, p. 1294-1309, 2011.

ASTOLFI, P. et al. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 148, p. 197-201, 2011.

ASTOLFI, P. et al. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 61, p. 289-295, 2012.

AUDENAERT, K. et al. *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 125, p. 445-458, 2009.

BAIRD, R. E. et al. Diversity and longevity of the soybean residue mycobiota in a no-tillage system. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, p. 530-534, 1997.

BERTELSEN, J. R.; NEERGAARD, E.; SMEDAGAARD-PETERSEN, V. Fungicidal effects of azoxystrobin and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, p. 190-205, 2001.

BEYER, M.; VERREET, J. A. Germination of *Gibberella zeae* ascospores as affected by age of spores after discharge and environmental factors. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 111, p. 381-389, 2005.

BEYER, M.; VERREET, J. A.; RAGAB, W. S. M. Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 98, p. 233–240, 2005.

BLANDINO, M.; MINELLI, L.; REYNERI, A. Strategies for the chemical control of Fusarium head blight: effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain. **European Journal of Agronomy**, Philadelphia, v. 25, p. 193-201, 2006.

BOUTIGNY, A. L. et al. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 48, p. 914-920, 2011.

BOUTIGNY, A. L. et al. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-013-0312-6>. Acesso em: 12/11/2013

BROWN, N. A. et al. The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. **Fungal Biology**, Philadelphia, v. 114, p. 535–571, 2010.

BROWN, N. A. et al. Characterisation of the *Fusarium graminearum*–wheat floral interaction. **Journal of Pathogens**, Nova York, 2011. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jpath/2011/626345/>. Acesso em: 10/02/2012.

BURLAKOTI, R. R. et al. Genetic relationships among populations of *Gibberella zeae* from barley, wheat, potato, and sugar beet in the upper Midwest of the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, p. 969-976, 2008.

BURLAKOTI, R. R. et al. Trichothecene profiling and population genetic analysis of *Gibberella zeae* from barley in North Dakota and Minnesota. **Phytopathology**, St. Paul, v. 101, p. 687-695, 2011.

CARISSE, O.; MELOCHE, C. M.; TURECHEK, W. W. Spatial heterogeneity, incidence-incidence and incidence-lesion density relationship of apple scab (*Venturia inaequalis*) in managed orchards. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 130, p. 349-365, 2011.

CASA, R. T. et al. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 29, p. 289–293, 2004.

CAVINDER, B. et al. Sexual development and ascospore discharge in *Fusarium graminearum*. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, v. 61, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460587/>. Acesso em: 27/03/2012.

CHANDLER, E. A. et al. Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium*

*graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Philadelphia, v. 62, p. 355–367, 2003.

CHEN, Y.; ZHOU, M. -G. Characterization of *Fusarium graminearum* isolates resistant to both carbendazim and a new fungicide JS399-19. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, p. 441-446, 2009.

CHEN, Y. et al. Integrated use of pyraclostrobin and epoxiconazole for the control of Fusarium head blight of wheat in Anhui Province of China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1495-1500, 2012.

CLEAR, R. M. et al. Deoxynivalenol levels and chemotype frequency in barley cultivars inoculated with two chemotypes of *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 35, p. 37-45, 2013.

COWGER, C. et al. Post-anthesis moisture increased Fusarium head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, p. 320-327, 2009.

COWGER, C.; ARELLANO, C. Plump kernels with high deoxynivalenol linked to late *Gibberella zeae* infection and marginal disease conditions in winter wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, p. 719-728, 2010.

CRANE, J. M. et al. Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of Fusarium head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 103, p. 146-155, 2013.

CULLER, M. D. et al. Effect of extended irrigation and host resistance on deoxynivalenol accumulation in Fusarium-infected wheat. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, p. 1464-1472, 2007.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, p. 414-430, 2012.

DEL PONTE, E. M.; SHAH, D. A.; BERGSTROM, G. C. Spatial patterns of Fusarium head blight in Nova Iorque wheat fields suggest role of airborne inoculum. **Online Plant Health Progress**, St. Paul, 2003. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitossan/epidemiologia/wp-content/uploads/2009/09/2003-delponte.shah.bergstrom.pdf>. Acesso em: 23/04/2011.

DEL PONTE, E. M. et al. Giberela do Trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 29, p. 587-605, 2004.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R. Factors affecting density of airborne *Gibberella zeae* inoculum. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 30, p. 55-60, 2005.

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**, Oxford, v. 155, p. 577-581, 2007.



DEL PONTE, E. M. A model-based assessment of the impacts of climate variability on Fusarium head blight seasonal risk in southern Brazil. **Journal of Phytopathology**, Oxford, 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**, Philadelphia, v. 132, p. 1087-1091, 2012.

DEL PONTE, E. M. et al. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex in Brazil shows high diversity and changes in species prevalence affected by host and geographic region. In: EUROPEAN FUSARIUM SEMINAR, 12, 2013, Bordeaux. **Proceedings...** Bordeaux: INRA, 2013. p. 150.

DESJARDINS, A. E. et al. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 9, p. 775-781, 1996.

DESJARDINS, A. Trichothecenes. In: Desjardins, A. (Ed.). **Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology**. The American Phytopathological Society, 2006, p. 13-64.

DE WOLF, E. D.; MADDEN, L. V.; LIPPS, P. E. Risk assessment models for wheat Fusarium head blight epidemics based on within-season weather data. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 428-435, 2003.

DILL-MACKY, R.; JONES, R. K. The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p. 71-76, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Berlin, v.19, p. 11-15, 1987.

DRAPER, N.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1981.

DUFAULT, N. S. et al. Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 637-644, 2006.

DUBOS, T. et al. Evidence for natural resistance towards trifloxystrobin in *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 130, p. 239-248, 2011.

EL-ALLAF, S. M.; MADDEN, L. V.; LIPPS, P. E. Spatial aspects of Fusarium head blight epidemics on wheat in Ohio. In: NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, n°. , 2002, Erlanger. **Proceedings...** Erlanger: Editora, 2002. p. 148-150.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. **EFSA Journal**, Bari, v. 11, p. 3262-3381, 2013.

EUDES, F. et al. Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 23, p. 318-322, 2001.

FAO. **Crop Prospects and Food Situation**. Rome: FAO, n. 3, p. 37, 2013.

FAN, J. et al. Characterization of the sterol 14a-demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. **New Phytologist**, Oxford, v. 198, 2013.

Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.12193/pdf>. Acesso em: 20/05/2012.

FERNANDEZ, M. R. Recovery of *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* from living and dead wheat and non-gramineous winter crops in southern Brazil. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 69, p. 1900-1906, 1991.

FERNANDES, J. M. C.; NICOLAU, M. A. Hierarchical bayesian approach to predict the risk of *Fusarium* head blight in wheat. In: EUROPEAN FUSARIUM SEMINAR, 12., 2013, Bordeaux. **Proceedings...**Bordeaux: INRA, 2013. p. 214.

FERNANDO, W. G. D. et al. Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat plots. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 414-421, 1997.

FOROUD, N. A. et al. Greenhouse studies reveal increased aggressiveness of emergent Canadian *Fusarium graminearum* chemotypes in wheat. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1271-1279, 2012.

FUENTES, R. G. et al. Resource allocation and cultivar stability in breeding for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 1965-1972, 2005.

FUENTES-BUENO, I. **Dissection of fertility barriers among lineages of *Gibberella zeae***. Thesis (Master of Science)- Kansas State University, p. 135, 2012.

GALE, L. R. et al. Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in eastern China. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 1315-1322, 2002.

GALE, L. R. et al. Population subdivision of *Fusarium graminearum* sensu stricto in the upper Midwestern United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 1434-1439, 2007.

GALE, L. R. et al. Aggressiveness and mycotoxin potential of U.S. *Fusarium graminearum* populations in field-grown wheat and barley. In: NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, n°. 2009, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Editora, 2009. p. 173.

GALE, L. R. et al. Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in southern Louisiana. **Phytopathology**, St. Paul, v. 101, p. 124-134, 2011.

GARVEY, G. S. et al. Structural and functional characterization of TRI3 trichothecene 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. **Procedures of Science**, Oxford, v. 18, p. 747–761, 2009.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 110, p. 473-479, 2004.

GEISER, D. M. et al. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, St. Paul, v. 103, p. 400-408, 2013.

GENT, D. H.; FARNSWORTH, J. L.; JOHNSON, D. A. Spatial analysis and incidence–density relationships for downy mildew on hop. **Plant Pathology**, Oxford, v. 61, p. 37-47, 2012.

GILBERT, J.; WOODS, S. M.; KROMER, U. Germination of ascospores of *Gibberella zeae* after exposure to various levels of relative humidity and temperature. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. , p. 504-508, 2008.

GILBERT, J. et al. Ratio of 3-ADON and 15-ADON isolates of *Fusarium graminearum* recovered from wheat plants inoculated and incubated at various temperatures and from field nurseries. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 34, p. 112, 2012.

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

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 1397-1404, 2005.

GUO, X. W.; FERNANDO, W. G. D.; SEOW-BROCK, H. Y. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, p. 756-762, 2008.

GROTH, J. V.; OZMON, E. A.; BUSCH, R. H. Repeatability and relationship of incidence and severity measures of scab of wheat caused by *Fusarium graminearum* in inoculated nurseries. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, p. 1033-1038, 1999.

HALLEN-ADAMS, H. E. et al. Deoxynivalenol biosynthesis-related gene expression during wheat kernel colonization by *Fusarium graminearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 101, p. 1091-1096, 2011.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. et al. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS E HPLC/UV-FL. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 1244-1249, 2012.

HUGHES, G.; MADDEN, L. V. Aggregation and incidence of disease. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, p. 657-660, 1992.

ILGEN, P. et al. Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 22, p. 899-908, 2009.

INCH, S. A.; GILBERT, J. Survival of *Gibberella zeae* in Fusarium-damaged wheat kernels. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 282-287, 2003.

JANSEN, C. et al. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. **PNAS**, Washington, v. 102, p. 16892-16897, 2005.

JENNINGS, P. et al. Determination of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, p. 643-652, 2004.

KARUGIA, G. W. et al. Population structure of the *Fusarium graminearum* species complex from a single Japanese wheat field sampled in two consecutive years. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, p. 170-174, 2009.

KELLER, M. D. et al. Local distance of wheat spike infection by released clones of *Gibberella zeae* disseminated from infested corn residue. **Plant Disease**, St. Paul, v. 94, p. 1151-1155, 2010.

KELLER, M. D.; THOMASON, W. E.; SCHMALE, D. G., III. The spread of a released clone of *Gibberella zeae* from different amounts of infested corn residue. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, p. 1458-1464, 2011.

KELLER, M. D.; BERGSTROM, G. C.; SHIELDS, E. J. The aerobiology of *Fusarium graminearum*. **Aerobiologia**, Wageningen, v. 29, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10453-013-9321-3>. Acesso em: 20/10/2013.

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

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

KRISS A. B.; PAUL P. A.; MADDEN L. V. Variability in Fusarium head blight epidemics in relation to global climate fluctuations as represented by the El Niño-Southern oscillation and other atmospheric patterns. **Phytopathology**, St. Paul, v. 102, p. 55-64, 2012a.

KRISS, A. B.; PAUL, P. A.; MADDEN, L. V. Characterizing heterogeneity of disease incidence in a spatial hierarchy: A case study from a decade of observations of *Fusarium* head blight of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 102, p. 867-877, 2012b.

KUHNEM JÚNIOR, P. R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, p. 583-588, 2013.

LANDSCHOOT, S. et al. Connection between primary *Fusarium* inoculum on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheat ears in Flanders, Belgium. **Crop Protection**, Philadelphia, v. 30, p. 1297–1305, 2011.

LANDSCHOOT, S. et al. Influence of maize-wheat rotation systems on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol content in wheat under low versus high disease pressure. **Crop Protection**, Philadelphia, v. 52, p. 14-21, 2013.

LEATHERHEAD FOOD RESEARCH. **Contaminants in Foodstuffs – An International Overview of Maximum Limits**. Leatherhead: Leatherhead Food Research, 2010. 2 v.

LEE, J. et al. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 3289-3295, 2009.

LEMMENS, M. et al. The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, p. 1318-1324, 2005.

LEPLAT, J. et al. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. **Agricultural Sustainable Development**, Dijon Cedex, v. 33, p. 97-111, 2013.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell IA, USA: Publishing, Ames, 2006. p. 388.

LOGRIECO, A. et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 82-85, 2002.

MADDEN, L. V.; HUGHES, G. Plant disease incidence: Distributions, heterogeneity, and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 33, p. 529-564, 1995.

MALBRÁN, I. et al. Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. **Crop Protection**, Philadelphia, v. 42, p. 234-243, 2012.

MALBRÁN, I. et al. Toxigenic capacity and trichothecene production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and their relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. **Phytopathology**, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24168045>. Acesso em: 20/08/2013.

MALDONADO-RAMIREZ, S. L. **Aerobiology of the wheat scab fungus, *Gibberella zeae***: Discharge, atmospheric dispersal, and deposition of ascospores. Dissertation (Ph.D.), Cornell University, 2001.

MALDONADO-RAMIREZ, S. L. et al. The relative abundance of viable spores of *Gibberella zeae* in the planetary boundary layer suggests the role of long-distance transport in regional epidemics of Fusarium head blight. **Agricultural Forest Meteorology**, Philadelphia, v. 132, p. 20-27, 2005.

MARKELL, S. G.; FRANCL, L. J. Fusarium head blight inoculum: Species prevalence and *Gibberella zeae* spore type. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 814–820, 2003.

MARTINELLI, J. et al. **Soybean is a host for *Fusarium graminearum***. In: NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, 2001, Erlanger, KY. **Proceedings**... Erlanger, KY: Editora, 2001. p. 136.

McCALLUM, B. D.; TEKAUZ, A.; GILBERT, J. Barrage zone formation between vegetatively incompatible *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 432-437, 2004.

McMULLEN, M. et al. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1712-1728, 2012.

MCROBERTS, N.; HUGHES, G.; MADDEN, L. V. The theoretical basis and practical application of relationships between different disease intensity measurements in plants. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 142, p. 191–211, 2003.

MESTERHÁZY, Á. et al. Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. **Plant Breeding**, Oxford, v.118, p. 97–110, 1999.

MESTERHÁZY, Á.; BARTOK, T.; LAMPER, C. Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of Fusarium head blight. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 1107–1115, 2003.

MESTERHÁZY, A. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to Fusarium head blight. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 108, p. 675-684, 2002.

MESTERHÁZY, Á. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. **Plant Breeding**, Oxford, v. 114, p. 377–386, 2006.

MIROCHA, C. J. et al. Analysis of deoxynivalenol and its derivatives (batch and single kernel) using gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 1414-1418, 1998.

MUGRABI DE KUPPLER, A. L. et al. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 151, p. 78-86, 2011.

NIELSEN, L. K. et al. *TRI2* based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 157, p. 384-392, 2012.

NITA, M. et al. Effect of corn residue level on disease intensity of Fusarium head blight (FHB) and on deoxynivalenol (DON) concentration: A multi-state field study. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. S85, 2006.

OBANOR, F. et al. *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* caused the 2010 head blight epidemics in Australia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, p. 79-91, 2013.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **PNAS**, Washington, v. 95, p. 2044-2049, 1998.

O'DONNELL, K. et al. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum* the fungus causing wheat scab. **PNAS**, Washington, v. 97, p. 7905-7910, 2000.

O'DONNELL, K. et al. Genealogical concordance between the 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**, Philadelphia, v. 41, p. 600-623, 2004.

PALAZZINI, J. M. et al. Biocontrol and population dynamics of *Fusarium* spp. on wheat stubble in Argentina. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, p. 859-866, 2013.

PAN, D. et al. Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 162, p. 120-123, 2013.

PANISSON, E.; ERLEI M. R.; BOLLER, W. Quantificação de propágulos de *Gibberella zeae* no ar e infecção de anteras em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 27, p. 484-488, 2002.

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

PARK, B. et al. Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 39, p. D640–D646, 2011.

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

PAUL, P. A. et al. Rain splash dispersal of *Gibberella zeae* within wheat canopies in Ohio. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 1342-1349, 2004.

PAUL, P. A. et al. Relationships between incidence and severity of Fusarium head blight on winter wheat in Ohio. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 1049-1060, 2005a.

PAUL, P. A.; LIPPS, P. E.; MADDEN, L. V. Relationship between visual estimates of Fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: A meta-analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 1225-1236, 2005b.

PAUL, P. A. et al. A distributed lag analysis of the relationship between *Gibberella zeae* inoculum density on wheat spikes and weather variables. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 1608-1624, 2007.

PAUL, P. A. et al. Efficacy of triazole-based fungicides for Fusarium head blight and deoxynivalenol control in wheat: a multivariate meta-analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, p. 999–1011, 2008.

PAULITZ, T. C. Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 674–678, 1996.

PASQUALI, M. et al. Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 137, p. 246-253, 2010.

PATAKY, J. K.; HEADRICK, J. M. Relationships between common rust incidence and severity on a susceptible and a partially resistant sweet corn hybrid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, p. 1155-1160, 1988.

PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R.; SIMS, A. L. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, p. 724-730, 2004.

PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium head blight inoculum. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, p. 800-807, 2008.

PILLAR, V. D.; ORLÓCI, L. On randomization testing in vegetation science: multifactor comparisons of relevé groups. **Journal of Vegetation Science**, Oxford, v. 7, p. 582-592, 1996.



PILLAR, V. D. How sharp are classifications? **Ecology**, Washington, v. 80, p. 2508-2516, 1999a.

PILLAR, V. D. The bootstrapped ordination reexamined. **Journal of Vegetation Science**, Oxford, v. 10, p. 895-902, 1999b.

PILLAR, V. D. **MULTIV software para análise multivariada, testes de aleatorização e autoreamostragem “bootstrap”, v.2.4.2.** Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PROCTOR, R. H.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, St. Paul, v. 8, p. 593-601, 1995.

PRUSSIN, A. J. **Monitoring and predicting the long distance transport of *Fusarium graminearum*, causal agent of Fusarium head blight in wheat and barley.** p. 172. Tese (Ph.D.), Virginia Tech, 2013.

PURAHONG, W.; NIPOTI, P.; PISI, A.; LEMMENS, L.; PRODI, A. Aggressiveness of different *Fusarium graminearum* chemotypes within a population from Northern-Central Italy. **Mycoscience**, Wageningen, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1340354013001241>. Acesso em: 16/08/2013.

PURI, K. D.; ZHONG, S. 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**, St. Paul, v. 100, p. 1007-1014, 2010.

QU, B. et al. Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, p.15–24, 2008.

QUARTA, A. et al. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. **FEMS**, Oxford, v. 259, p. 7-13, 2006.

RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 106, p. 291-296, 2004.

RAMIREZ, M. L. et al. Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, p. 1115–1120, 2007.

REIS, E. M. **Doenças do trigo III. Giberela.** 2. ed. São Paulo: Editora, 1988.

REIS, E. M. Perithecial formation of *Gibberella zeae* on senescent stems of grasses under natural conditions. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 15, p. 52-54, 1990a.

REIS, E. M. Effect of rain and relative humidity on the release of ascospores and on the infection of wheat heads by *Gibberella zeae*. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 15, p. 339–343, 1990b.

REIS, E. M. et al. Grain losses caused by the infection of wheat heads by *Gibberella zeae* in southern Brazil, from 1984 to 1994. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 22, p. 134-137, 1996.

REIS, E. M.; CARMONA, M. A. Integrated disease management of Fusarium head blight. In.: MAGLIANO, T. M. A.; CHULZE, S. N. (Ed.). **Fusarium head blight in Latin America**. Oxford: Springer, 2013. p. 159-174.

REYNOSO, M. M. et al. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 28, p. 444-448, 2011.

ROSSI, V. et al. Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing Fusarium head blight. **Journal of Plant Pathology**, Philadelphia, v. 83, p. 189-198, 2001.

SALGADO, J. D. et al. Grain harvesting strategies to minimize grain quality losses due to Fusarium head blight in wheat. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, p. 1448-1457, 2011.

SAMPIETRO, D. A. et al. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 145, p. 359-364, 2012.

SANOGO, S.; YANG, X. B. Overview of selected multivariate statistical methods and their use in phytopathological research. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 1004-1006, 2004.

SARVER, B. J. et al. Novel Fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 48, p. 1096-107, 2011.

SCHAAFSMA, A. W.; TAMBURIC-ILINCIC, L.; HOOKER, D. C. Effect of previous crop, tillage, field size, adjacent crop, and sampling direction on airborne propagules of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*, Fusarium head blight severity, and deoxynivalenol accumulation in winter wheat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 27, p. 217-224, 2005.

SCHERM, B. et al. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 14, p. 323-341, 2013.

SCHMALE, D. G. III; SHAH, D. A.; BERGSTROM, G. C. Spatial patterns of viable spore deposition of *Gibberella zeae* in wheat fields. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 472–479, 2005.

SCHMALE, D. G. III; SHIELDS, E. J.; BERGSTROM, G. C. Night-time spore deposition of the Fusarium head blight pathogen, *Gibberella zeae*, in rotational wheat fields. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 28, p. 100-108, 2006a.

SCHMALE, D. G. III et al. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. 1021-1026, 2006b.

SCHMALE, D. G. III et al. Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 909–917, 2011.

SCHMALE, D. G. III et al. Isolates of *Fusarium graminearum* collected 40–320 meters above ground level cause Fusarium head blight in wheat and produce trichothecene mycotoxins. **Aerobiologia**, Wageningen, v. 28, p. 1-11, 2012.

SCHROEDER, H. W.; CHRISTENSEN, J. J. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 53, p. 831-838, 1963.

SCOZ, L. B. et al. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, p. 344-351, 2009.

SEEM, R. C. Disease incidence and severity relationships. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 22, p. 133-150, 1984.

SHAH, D. A. et al. Predicting Fusarium head blight epidemics with weather-driven pre- and post-anthesis logistic regression models. **Phytopathology**, St. Paul, v. 103, p. 906-919, 2013.

SHANER, G. Epidemiology of Fusarium head blight of small grain cereals in North America. In.: LEONARD, K. J.; BUSHNELL, W. R. (Ed.), **Fusarium Head Blight of Wheat and Barley**. St. Paul, MN: APS Press. 2003. p. 84-119.

SHEN, C. -M. et al. Geographic distribution of trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* species complex in major winter wheat production areas of China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1172-1178, 2012.

SILVA, C. N. **Identificação molecular de espécies de *Fusarium* e genes preditivos de micotoxinas associadas a grãos de milho e trigo no centro sul do Brasil**. 2011. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 2011.

SILVA-ACUNA, R. et al. Incidence-severity relationships in the *Coffea arabica*-*Hemileia vastatrix*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, p. 186-188, 1999.

SIOU, D. et al. Effect of wheat spike infection timing on Fusarium head blight development and mycotoxin accumulation. **Plant Pathology**, Oxford, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12106/abstract>. Acesso em: 05/08/2013.

SKINNES, H. et al. The inheritance of anther extrusion in hexaploid wheat and its relationship to Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol content. **Plant Breeding**, Oxford, v. 129, p. 149-155, 2010.

SNIJDERS, C. H. A. Resistance in wheat to Fusarium infection and trichothecene formation. **Toxicology Letter**, Philadelphia, v. 153, p. 37-46, 2004.

SOMMA, S. et al. Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterization of their molecular and chemical chemotypes. **Crop and Pasture Science**. Disponível em: <[www.publish.csiro.au/view/journals/](http://www.publish.csiro.au/view/journals/)> Acesso em: 5/10/2013.

SOMMERHALDER, R. J. et al. Effect of hosts on competition among clones and evidence of differential selection between pathogenic and saprophytic phases in experimental populations of the wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. **BMC Evolutionary Biology**, Wageningen, v. 11, p. 188-196, 2011.

SPOLTI, P. et al. Phenotypic and pathogenic traits of two species of the *Fusarium graminearum* complex possessing either 15-ADON or NIV genotype. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 133, p. 621-629, 2012.

SPOLTI, P. et al. Single and sequential applications of metconazole alone or in mixture with pyraclostrobin to improve Fusarium head blight control and wheat yield in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 38, n. , p. 85-96, 2013a.

SPOLTI, P., DEL PONTE, E. M. Agressividade diferencial de espécies do complexo *Fusarium graminearum* em interação com o fungicida tebuconazole na redução do rendimento de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, p. 1569-1575, 2013b.

STARKEY, D. E. et al. Global molecular surveillance reveals novel Fusarium head blight species and trichothecene diversity. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 44, p. 1191-1204, 2007.

STENGLEIN, S. A. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. **Journal of Plant Pathology**, Philadelphia, v. 91, p. 25-36, 2009.

STRANGE, R. N.; SMITH, H. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. **Physiological Plant Pathology**, Philadelphia, v. 1, p. 141-150, 1971.

SUGITA-KONISHI, Y.; NAKAJIMA, T. Nivalenol: the mycology, occurrence, toxicology, analysis and regulation. In.: **Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons**. RAI, M.; VARMA, A. (Ed.) Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. 2010.

SUFFERT, F.; MONTFORT, F. Pathometric relationships reveal epidemiological processes involved in carrot cavity spot epidemics. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 122, p. 425-436, 2008.

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

SUGA, H. et al. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, p. 159-166, 2008.

TALAS, F.; KALIH, R.; MIEDANER, T. Within-field variation of *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness and deoxynivalenol production in wheat head blight. **Phytopathology**, St. Paul, v. 102, p. 128-134, 2012.

TANAKA, T. et al. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, p. 979-983, 1988.

THAMMAWONG, M. et al. Distribution of deoxynivalenol and nivalenol in milling fractions from *Fusarium*-infected Japanese wheat cultivars. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 73, p. 1817-1823, 2010.

THUVANDER, A.; WIKMAN, C.; GADHASSON, I. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. **Food Chemical Toxicology**, Philadelphia, v. 37, p. 639-648, 1999.

TÓTH, B. et al. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 13, p. 35-45, 2005.

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

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

TRAIL, F.; GAFFOOR, I.; VOGEL, S. Ejection mechanics and trajectory of the ascospores of *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 42, p. 528-33, 2005.

TUNALI, B. et al. Fitness of three *Fusarium* pathogens of wheat. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 81, p. 596-609, 2012.

TURECHEK, W. W. et al. Comments regarding the binary power law for heterogeneity of disease incidence. **Phytopathology**, St. Paul, v. 101, p. 1396-1407, 2011.

UMPIÉRREZ-FAILACHE, M. et al. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 166, p. 135-40, 2013.

VON DER OHE, C. et al. A comparison of aggressiveness and deoxynivalenol production between Canadian *Fusarium graminearum* isolates with 3-acetyl and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes in field-grown spring wheat. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 127, p. 407–417, 2010.

VON DER OHE, C.; MIEDANER, T. Competitive aggressiveness in binary mixtures of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates inoculated on spring wheat with highly effective resistance QTL. **Journal of Phytopathology**, Philadelphia, v. 159, p. 401-410, 2011.

WAALWIJK, C. et al. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 109, p. 743–754, 2003.

WANG, J. -A. et al. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. **Toxins**, Basel, v. 3, p. 1020-1037, 2011.

WARD, T. J. et al. Ancestral polymorphisms and adaptive evolution in the tricothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium graminearum*. **PNAS**, Washington, v. 99, p. 9278-9283, 2002.

WARD, T. J. et al. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 45, p. 473–484, 2008.

WEGULO, S. N. et al. Effects of integrating cultivar resistance and fungicide application on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in winter wheat. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, p. 554–560, 2011.

WEGULO, S. N. Factors Influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. **Toxins**, Basel, v. 4, p. 1157-1180, 2012.

WILDE, F.; MIEDANER, T. Selection for *Fusarium* head blight resistance in early generations reduces the deoxynivalenol (DON) content in grain of winter and spring wheat. **Plant Breeding**, Oxford, v. 125, p. 96-98, 2006.

WILHELM, K. P.; JONES, R. K. Meso- and microscale patterns of *Fusarium* head blight in spring wheat fields in Minnesota. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 474-479, 2005.

WILLYERD, K.T. et al. Efficacy and stability of integrating fungicide and cultivar resistance to manage *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 957–967, 2012.

XU, X. -M.; MADDEN, L. V. Incidence and density relationships of powdery mildew on apple. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 1005-1014, 2002.

XU, X.; NICHOLSON, P. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 47, p. 83-103, 2009.

XU, X. -M. et al. Relationship between the incidences of ear and spikelet infection of *Fusarium* ear blight in wheat. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 110, p. 959-971, 2004.

YLI-MATTILA, T. et al. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, p. 841-852, 2009.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A. decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, Oxford, v. 14, p. 415-421, 1974.

ZHAN, J., McDONALD, B. A. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 1689-1701, 2011.

ZHAN, J.; McDONALD, B. A. 2013. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 51, p. 131-153, 2013.

ZHANG, H. et al. Population genetic analyses of *Fusarium asiaticum* populations from barley suggest a recent shift favoring 3ADON producers in southern China. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, p. 328-336, 2010.

ZHANG, Y. J. et al. Quantification of *Fusarium graminearum* in harvested grain by real-time polymerase chain reaction to assess efficacies of fungicides on *Fusarium* head blight, deoxynivalenol contamination, and yield of winter wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, p. 95-100, 2009.

ZHANG, H. et al. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. **PlosOne**, San Francisco, v. 7, p. 1-13, 2012.

ZHANG, J.-B. et al. Natural occurrence of *Fusarium* head blight, mycotoxins and mycotoxin-producing isolates of *Fusarium* in commercial fields of wheat in Hubei. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, p. 92-102, 2013.

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

ZELLER, K. A.; BOWDEN, R. L.; LESLIE, J. F. Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from USA. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 63-571, 2004.