

FRANKLIN JACKSON MACHADO

GIBERELA DO TRIGO: RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS E METANÁLISE DA  
EFICÁCIA DO CONTROLE QUÍMICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Machado, Franklin Jackson, 1991-

M149g Giberela do trigo : resistência a fungicidas e metanálise da  
2016 eficácia do controle químico / Franklin Jackson Machado. –  
Viçosa, MG, 2016.

xii, 78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fungicidas - Uso. 2. Produtos químicos agrícolas.  
3. Trigo - Doenças e pragas. 4. *Triticum aestivum*. 5. *Fusarium  
graminearum*. 6. *Gibberella zeae*. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de  
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.952

FRANKLIN JACKSON MACHADO

GIBERELA DO TRIGO: RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS E METANÁLISE DA  
EFICÁCIA DO CONTROLE QUÍMICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2016



Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Coorientador)



Miller da Silva Lehner



Emerson Medeiros Del Ponte  
(Orientador)

*'Be humble because until the sun and all its grandeur, let the moon shine.'*

“Seja humilde, pois até o sol com toda sua grandeza deixa a lua brilhar.”

**(Bob Marley)**

*Aos meus amados pais, Lena e Olegário*

*Às minhas queridas irmãs, Flávia e Cláudia*

*À minha companheira de todas as horas, Aline*

*Aos meus familiares e amigos que sempre torceram por mim*

***dedico.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado o dom da vida e por colocar tantas pessoas boas e generosas ao meu redor.

Agradeço a minha mãe, Lena, por sua força e pelo amor incondicional que tem por mim. Ao meu pai, Olegário, pela amizade e pelas palavras de apoio. Às minhas irmãs, Cláudia e Flávia, pelo carinho e pelas orações, que me ajudaram a não desistir. Aos meus sobrinhos, Daniel e Arthur, por me proporcionarem momentos de paz em meio a toda turbulência nesses últimos dias.

À minha companheira de todas as horas e situações, Aline, pelo amor e carinho e por sempre confiar em minha capacidade.

À toda minha família, pela compreensão da minha ausência e por sempre torcer por mim.

Ao Prof. Emerson, pela amizade, por confiar em mim desde o primeiro momento em que me aceitou com seu orientado e pelos ensinamentos que vou levar para toda vida.

Ao coorientador Prof. Eduardo Mizubuti pelos ensinamentos e por ceder toda estrutura de seu laboratório. De maneira especial, à toda equipe do Laboratório de Biologia de Populações, pela atenção e paciência.

Ao Prof. Dauri por ceder os isolados usados no trabalho de sensibilidade e a Cleiltan por toda ajuda e disponibilidade em tirar qualquer dúvida.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa pelos conhecimentos adquiridos durante o curso de Agronomia. Aos técnicos administrativos que sempre foram muito solícitos em ajudar.

Aos amigos de laboratório pelo ótimo convívio e amizade. Em especial à Maíra, Letícia, Priscilla, aos melhores estagiários Renato e Gustavo por serem extremamente prestativos e responsáveis, a Camila pela amizade e ajuda desde o início.

Aos amigos Henrique, Ueder e Prof. Fabrício por toda ajuda e pela minha formação durante a graduação, enquanto estagiário.

Aos colegas de mestrado, por compartilhar as horas de estudos e torna-las mais agradáveis.

Aos amigos de Viçosa Alan, Daiane, Guilherme, Josi, Dalton, Patrícia, Rodrigo, Bruna, Raphael e Lucas por toda amizade e por serem me segunda família durante os últimos sete anos.

Aos amigos de república, Thales, Lucas, Neri, Pablo e Evandro pela amizade e os momentos de descontração.

Aos amigos de infância, Caio, Erik, Flávio, Wanderson pela amizade e que mesmo na minha ausência sempre torceram por mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e o Programa de Pós-graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

**Muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

FRANKLIN JACKSON MACHADO, filho de Lenilda de Oliveira Xavier Machado e Olegário de Souza Machado, nasceu em Salinas, Minas Gerais, em 23 de junho de 1991.

Em março de 2009, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em março de 2014.

Foi bolsista de iniciação científica no Departamento de Fitopatologia da UFV no período de 2012 a 2014, onde desenvolveu atividades de pesquisa em manejo integrado de doenças de plantas.

Em março de 2014, iniciou no Programa de Pós-graduação, a nível de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Prof. Emerson Medeiros Del Ponte, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2016.

## SUMÁRIO

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| RESUMO .....            | VII |
| ABSTRACT .....          | X   |
| INTRODUÇÃO GERAL .....  | 1   |
| REFERÊNCIAS .....       | 4   |
| ARTIGO 1.....           | 8   |
| ARTIGO 2.....           | 43  |
| CONCLUSÕES GERAIS ..... | 78  |

## RESUMO

MACHADO, Franklin Jackson, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Giberela do trigo: resistência a fungicidas e metanálise da eficácia do controle químico.** Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte. Coorientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Os fungicidas são normalmente aplicados para o manejo da giberela com o objetivo de garantir a produtividade e reduzir níveis de micotoxinas associadas à doença. Vários ingredientes ativos estão disponíveis no Brasil, sendo que os mais comumente recomendados pertencem ao grupo dos inibidores da demetilação (DMI) e benzimidazóis (MBC), ou usados em mistura com fungicidas do grupo das estrobilurinas (QoI). Dada a importância crescente de epidemias de giberela no Brasil, o uso de fungicidas vêm aumentando consideravelmente e, geralmente, duas aplicações têm sido recomendadas. Parcelas de campo em 16 municípios na região de Guarapuava, Sul do Paraná foram monitoradas durante quatro anos (2011 a 2014) e um total de 227 isolados semelhantes a espécies do complexo de espécies de *Fusarium graminearum* foram obtidos a partir de espigas de trigo sintomáticas. Uma amostra de 173 isolados foi identificada quanto ao genótipo tricoteceno com base em PCR. Entre eles, 67% foram identificados como 15-(A)cetil-desoxinivalenol(DON), 29% do nivalenol (NIV) e 4% como genótipo 3-ADON. Uma amostra de 35 isolados foi selecionada para determinar a concentração dos fungicidas tebuconazol e carbendazim que reduz em 50% do crescimento de micelial ( $EC_{50}$ ), usando as seguintes doses (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ). As médias estimadas de  $EC_{50}$ , independente do genótipo, foram 0,39  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (0,0004 a 3,0) e 1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (0,91 a 2,65) para tebuconazol e carbendazim, respectivamente. As médias de  $EC_{50}$  foram 1,32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 1,21  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para carbendazim e 0,58  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 0,05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para tebuconazol, para os isolados 15-ADON e NIV ou 3-ADON, respectivamente. O teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov mostrou diferença entre os isolados 15-ADON e os NIV+3-ADON quanto ao tebuconazol ( $P = 0,002$ ), mas não para o carbendazim ( $P = 0,514$ ). As doses discriminatórias de 1,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 2,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  foram usadas para identificar isolados menos sensíveis à carbendazim e tebuconazol, respectivamente, em toda coleção. Baseado nessas doses, dois isolados menos sensíveis ao tebuconazol e seis isolados menos sensíveis ao carbendazim foram encontrados, sendo todos originários do município de Guarapuava ao longo de três safras e possuem o genótipo 15-ADON. Houve correlação

significativa entre os valores de  $EC_{50}$  dos dois fungicidas ( $r = 0,45$ ;  $P = 0,007$ ). Um único isolado apresentou os maiores valores de  $EC_{50}$  para ambos fungicidas e apresentou uma mutação (R31K) no gene *cyp51A*. A presença da reduzida sensibilidade e um isolado resistente, reportado pela primeira vez no Brasil, sugerem que a seleção pode conduzir mudanças nas populações com consequências no manejo da doença. Estudos futuros devem se concentrar em atributos de fitness, competitividade e experimentos *in vivo* para verificar se a eficácia do fungicida é prejudicada na presença de isolados menos sensíveis. Em estudos de controle químico da giberela, resultados sobre a eficácia têm sido inconsistentes e variáveis para um mesmo fungicida. Uma revisão sistemática de estudos de eficácia dos fungicidas pode ser útil para apontar para os produtos mais eficazes e cenários onde a eficácia pode ser melhorada. Os objetivos deste trabalho foram a) revisar sistematicamente estudos de controle químico para o manejo da giberela realizados no Brasil durante os últimos 15 anos (2000-2015), publicados em revistas com e sem corpo editorial e b) conduzir uma metanálise da eficácia de controle e retorno em produtividade de fungicidas selecionados. Uma busca na literatura identificou 18 estudos que relataram a severidade da giberela (o mesmo que índice giberela) para pelo menos um tratamento com fungicida em comparação com um tratamento controle sem o fungicida, e também uma medida da variância amostral do ensaio. Apenas três e dois estudos relataram valores médios de grãos giberelados e deoxinivalenol (DON), respectivamente. Os estudos foram analisados e oito tratamentos com fungicidas, com pelo menos dez entradas foram selecionados para o estudo de metanálise. Foram incluídos os tratamentos com os fungicidas dos grupos: DMI (tebuconazol, metconazol e propiconazol) e MBC (carbendazim) formulados individualmente e uma pré-mistura de DMI + QoI (azoxistrobina + tebuconazol, piraclostrobina + metconazol, trifloxistrobina + prothioconazol e trifloxistrobina + tebuconazol). Foram testadas uma aplicação ( $\times 1$ ) e duas aplicações ( $\times 2$ ), sendo a primeira na floração plena e a segunda dez dias após. Um modelo metanalítico multivariado foi ajustado para o log das médias para cada fungicida e o tratamento controle de cada ensaio. A diferença nas estimativas médias do log da severidade entre um tratamento com fungicida e o controle foram usadas para calcular a razão de resposta média ( $R$ ) e então transformadas para porcentagem de controle ( $C$ ) e porcentagem de retorno em produtividade ( $P$ ). A média de  $C$  e  $P$  variou de 48,94 a 70,39% e de 7,41 a 21,29%, respectivamente. Metconazol ( $\times 2$ ) teve o melhor desempenho para reduzir a severidade da doença ( $C = 70,39\%$ ) e tebuconazol ( $\times 1$ ) em retorno em produtividade ( $P = 21,29\%$ ). Propiconazol foi o menos eficaz entre os DMIs ( $C =$

48,94%), seguido de carbendazim ( $C = 53,90\%$ ). Em geral, os fungicidas mais eficazes resultaram em maior retorno de rendimento. Quando os grupos de fungicidas foram comparados, em geral, os DMIs e as misturas tiveram o melhor desempenho, especialmente em ensaios conduzidos sob elevada pressão da doença ( $> 7\%$  no tratamento controle). Os resultados mostraram que a eficácia de controle média em estudos brasileiros quando se utiliza duas aplicações são mais elevadas do que quando se utiliza apenas uma aplicação, como relatado em outro estudo de metanálise na América do Norte. Estudos futuros deverão centrar-se no efeito sobre os níveis de DON, especialmente para as misturas, que estão estrategicamente utilizadas para o controle de doenças foliares.

## ABSTRACT

MACHADO, Franklin Jackson, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Fusarium head blight of wheat: resistance to fungicides and meta-analysis of control efficacy.** Adviser: Emerson Medeiros Del Ponte. Co-Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Fungicides are commonly applied for managing Fusarium head blight (FHB) with the aim of protecting yield and improving grain quality, but especially targeting mycotoxin reduction. Several active ingredients are available in Brazil and the most common belong to the demethylation-inhibitor (DMI) and benzimidazoles (MBC) groups, with the former commonly used in mixture with fungicides of the quinone-outside inhibitor (QoI) group. Given the increasing importance of FHB epidemics in Brazil, the use of fungicides is increasing considerably and usually two sprays are recommended. Experimental trials where fungicides have been applied for FHB control were monitored in 16 municipalities at the Guarapuava region, Southern Paraná, during four years (2011 to 2014). A total of 227 isolates resembling those of the *Fusarium graminearum* species complex were obtained from wheat heads with FHB symptoms. Of those, 173 isolates were assigned to trichothecene genotypes based on PCR assays. A random sample of 35 isolates from 2011 to 2013 was selected to determine the concentration of tebuconazole and carbendazim fungicides that reduces 50% of the mycelial growth ( $EC_{50}$ ). The following doses were used: 0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0  $\mu\text{g/ml}$ . In the PCR assays, most isolates (67%) were of the 15-(A)cetyl-deoxynivalenol (DON), 29% of the nivalenol (NIV) and 4% of the 3-ADON genotype. The estimated means of the  $EC_{50}$ , irrespectively of the genotype, were 0.39  $\mu\text{g/ml}$  (0.0004 to 3.0) and 1.25  $\mu\text{g/ml}$  (0.91 to 2.65) for tebuconazole and carbendazim, respectively. The mean  $EC_{50}$  were 1.32  $\mu\text{g/ml}$  and 1.21  $\mu\text{g/ml}$  for carbendazim and 0.58  $\mu\text{g/ml}$  and 0.05  $\mu\text{g/ml}$  for tebuconazole, for isolates of the 15-ADON and NIV + 3-ADON isolates, respectively. A Kolmogorov-Smirnov non-parametric test suggested that the sensitivity to tebuconazole of the 15-ADON and NIV+3-ADON isolates were sampled from populations with different distributions ( $P = 0.002$ ), but not for carbendazim ( $P = 0,514$ ). Discriminatory doses of the 1.4  $\mu\text{g/ml}$  and 2.0  $\mu\text{g/ml}$  were used to screen for less-sensitive isolates in the whole sample. Based on those doses, two tebuconazole-less sensitive and six carbendazim-less sensitive isolates were found, all were originated from Guarapuava municipality across three growing seasons and possessed the 15-ADON

genotype. There was as significant correlation between the EC<sub>50</sub> values of tebuconazole and carbendazim ( $r = 0.45$ ;  $P = 0,007$ ). One isolate exhibited the highest EC<sub>50</sub> values for both fungicides and showed a mutation (R31K) in the *cyp51A* gene. The presence of less sensitive and a resistant isolate reported for the first time in Brazil suggest that selection may drive changes in the populations with impact in disease management. Future studies should focus on the attributes of fitness, competitiveness and *in vivo* assays to check whether fungicide efficacy is hindered in the presence of resistant isolates. Furthermore, results on fungicide efficacy have been inconsistent and variable for a same fungicide. Quantitative summary of fungicide data available in the country is lacking and could be useful to point to the most efficacious products and scenarios where efficacy can be improved. The objectives of this work were to a) systematically review the peer- and non-peer reviewed literature on chemical control studies for FHB management conducted in Brazil during the last 15 years and b) conduct a meta-analysis of the control efficacy and yield return of selected fungicides. A search in the literature identified 18 studies that reported FHB severity (same as FHB index) for least one fungicide treatment compared to a non-treated check, and also a measure of sampling variance in the trial. Only three and two studies reported mean values of Fusarium-damaged kernels (FDK) and deoxynivalenol (DON), respectively. Studies were scrutinized and eight fungicide treatments with at least 10 entries were selected for the meta-analysis study. They included DMI (tebuconazole, metconazole and propiconazole) and MBC (carbendazim) fungicide treatments formulated solo and a pre-mix of DMI+QoI (azoxystrobin + tebuconazole, pyraclostrobin + metconazole, trifloxystrobin + prothioconazole and trifloxystrobin + tebuconazole). One (×1) and two applications (×2) were tested, the first at full flowering and the second 10 days later. A multivariate meta-analytic model was fitted to the log of the means for each fungicide and check treatment of the trial. The difference in the mean estimates of the log of severity between a fungicide treatment and the check were used to calculate the mean response ratio represented by percentage control efficacy ( $C$ ) and percentage yield return ( $P$ ). Mean  $C$  and  $P$  ranged from 48.94 to 70.39% and from 7.41 to 21.29%, respectively. Metconazole (×2) performed best to reduce disease severity ( $C = 70.39\%$ ) and tebuconazole (×1) to increase yield ( $P = 21.29\%$ ). Propiconazole was the least efficacious among the DMIs (48.94%), followed by carbendazim (53.9%). In general, the most efficacious fungicides resulted in higher yield return. When fungicide groups were compared, the DMIs and the mixtures performed best in general, especially in trials conducted under high disease pressure (>7%

in the check treatment). Results showed that mean control efficacy in Brazilian studies when using two sprays are higher one spray, as reported in other meta-analysis study in North America. Future studies should focus on the effect on DON levels, especially for the mixtures, which are strategically used for the control foliar diseases.

## Introdução geral

A giberela do trigo, causada pelo complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC, *Fusarium graminearum* species complex), é uma das doenças mais destrutivas nas principais regiões tritícolas do mundo (McMullen et al. 1997). No Brasil, os primeiros relatos da giberela em trigo são da década de 1940 (Costa Neto 1947) e estratégias de manejo no país iniciaram na década de 1960 com a introdução de materiais resistentes e aplicações de fungicidas protetores (Deuner et al. 2011). Na década de 1970 e 1980 a doença era considerada de importância secundária em termos de danos na produtividade (Casa et al. 2011). No entanto, epidemias se tornaram mais frequentes a partir da década de 1990 no Brasil, assim como ao redor do mundo, em função de variações ou alterações nos padrões climáticos e ampla adoção de práticas conservacionistas de manejo do solo, tal como o plantio direto (Del Ponte et al. 2009; McMullen et al. 1997; McMullen et al., 2012). Danos na produtividade devido à giberela no Brasil em um período de mais de duas décadas (1984 a 2010) foram estimados em média de 18,62%, mas com grande variação entre os anos (Casa et al., 2011).

A giberela está associada com a presença de micotoxinas produzidas pelo fungo, dentre as quais se destacam os tricotecenos deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) e a zearalenona (ZEA), comumente detectados em amostras de grãos de lavouras comerciais de trigo no Brasil (Calori-Domingues et al. 2007; Del Ponte et al. 2012; Tralamazza et al. 2016). Assim, medidas legislativas, como o estabelecimento de limites máximos de tolerância para micotoxinas de *Fusarium*, incluindo deoxinivalenol e zearalenona, foram implementadas no Brasil (ANVISA, 2011), o que aumenta a importância da giberela para a cadeia produtora do trigo.

O manejo da giberela visa atualmente atender primariamente a legislação vigente para níveis máximos de micotoxinas (ANVISA, 2011), além da prevenção de danos na produtividade. Dentre as práticas de manejo, o uso dos fungicidas tem sido intensificado, sendo atualmente considerada uma das principais táticas no manejo de giberela em trigo e micotoxinas, juntamente com o uso de cultivares com menor susceptibilidade (Paul et al. 2008; McMullen et al. 2012; Wegulo 2012; Gilbert & Haber 2013). De maneira geral, a eficácia de controle da giberela se mostra bastante variável entre e dentre os grupos de princípios ativos, com resultados inconsistentes e com níveis, às vezes, aquém do desejado. Um estudo de metanálise nos Estados Unidos mostrou níveis médios de eficácia de controle da doença para DMIs e mistura de dois DMIs variando de 32 a 52% e de redução de micotoxinas ainda mais baixos variando de 12 a 45% (Paul et al. 2008).

Os fungicidas apresentam alta fungitoxidade *in vitro* (Chen et al. 2007; Spolti et al. 2012a). No entanto, a eficácia de controle no campo é relativamente mais baixa, dificultada por vários fatores, como: desuniformidade na emergência das espigas e das anteras, principal alvo de proteção; dificuldade de distribuição uniforme das gotas nas anteras e, em algumas vezes, atraso na aplicação devido às condições climáticas quando as infecções já estão estabelecidas (Deuner et al. 2011; Spolti & Del Ponte 2013).

A intensificação do uso de fungicidas no manejo de doenças aumenta o risco de surgimento de populações fúngicas resistentes, principalmente no caso de fungicidas sistêmicos, em que apresentam um sítio de ação específico (Lucas et al. 2015). No caso da giberela, uma redução na sensibilidade da população do patógeno foi relatada para triazóis (prothioconazol, metconazol e tebuconazol) na Europa em isolados coletados nos anos 1987 e 2004 (Klix et al. 2007). Também já foram encontrados isolados de FGSC altamente resistentes ao tebuconazol nos Estados Unidos e na China (Yin et al. 2009; Spolti et al. 2014). Com relação aos benzimidazóis, isolados resistentes ao carbendazim

foram encontrados na China (Liu et al. 2010; Zhang et al. 2013), com reflexos negativos na eficácia de controle da giberela.

A resistência aos fungicidas geralmente está relacionada a mutações pontuais nos genes que alterarão a sequência de aminoácidos no sítio de ação do fungicida (Ma & Michailides 2005; Lucas et al. 2015). Face ao aumento do uso de fungicidas para o controle da giberela no Brasil, é urgente que se intensifiquem estudos para monitoramento das populações do patógeno, especialmente em regiões onde aplicações sucessivas de fungicidas vêm sendo feitas de maneira contínua nos últimos anos. Até o momento são escassas as informações sobre sensibilidade da população de FGSC aos fungicidas mais utilizados para controlar a giberela em trigo no Brasil.

Considerando a ampla diversidade de fungicidas que vem sendo avaliada para o controle da giberela no Brasil e a inconsistência nos resultados, há necessidade de se sumarizar quantitativamente a informação disponível de forma a identificar as melhores opções e sob que condições o manejo da doença pode ser otimizado. A metanálise é uma técnica estatística de uso relativamente recente na Fitopatologia com objetivo de sumarizar, por meio de critérios definidos, resultados de estudos primários, publicados em revistas ou oriundos de ensaios cooperativos (Madden & Paul, 2011). A sumarização permite estimar a média e a incerteza na resposta a um determinado tratamento, com alvo em variáveis de interesse, como a supressão de níveis da doença e retorno ou incremento na produtividade da cultura, o que pode subsidiar análises econômicas a partir de cenários de risco.

A presente dissertação é estruturada em duas partes. Na primeira, objetivou-se i) determinar a sensibilidade a fungicidas em populações FGSC associado à giberela do trigo oriunda de uma série de anos na região produtora de Guarapuava, sul do Paraná, aos

fungicidas carbendazim e tebuconazol; ii) investigar a presença de marcador molecular associado à resistência a esses dois fungicidas.

Na segunda parte, os objetivos foram: i) revisar sistematicamente os estudos sobre controle químico da giberela conduzidos no Brasil nos últimos 15 anos (a partir de 2000) e ii) estimar, por metanálise, a média e a heterogeneidade da eficácia de controle da doença (severidade) e do retorno em produtividade para um conjunto de fungicidas selecionados isoladamente ou agrupados por grupo químico.

### Referências

ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 26 fev. 2011. Seção 1, p. 66.

Calori-Domingues, M. A., Almeida, R. R., Tomiwaka, M. M., Gallo, C. R., Micotti, E., Tadeu, C., & Dias, S. (2007). Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 181–185.

Casa, R. T. & Kuhnem, P. R. (2011). Danos causados nos hospedeiros, in: Reis, E. M. (Eds). *Seminário sobre giberela em cereais de inverno: coletânea de trabalhos* (p. 73-86). Passo Fundo: Bertier.

Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S., & Zhou, M. (2007). Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Management Science*, 63, 1201–1207.

- Costa Neto K. P. (1947) Parasitas de plantas cultivadas no Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio
- Del Ponte, E. M., Fernandes, J. M. C., Pavan, W., & Baethgen, W. E. (2009). A model-based assessment of the impacts of climate variability on Fusarium head blight seasonal risk in Southern Brazil. *Journal of Phytopathology*, *157*, 675–681.
- Del Ponte, E. M., Garda-Buffon, J., & Badiale-Furlong, E. (2012). Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chemistry*, *132*, 1087–1091.
- Deuner, C. T., Viana, E., De Rossi, R. L. & Camera, J. (2011). Fungicidas indicados pela pesquisa, momento da aplicação e eficiência do controle de giberela na cultura do trigo , in: Reis, E. M. (Eds). *Seminário sobre giberela em cereais de inverno: coletânea de trabalhos* (p. 215-234). Passo Fundo: Bertier.
- Gilbert, J., & Haber, S. (2013). Overview of some recent research developments in Fusarium head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *35*, 149–174.
- Klix, M. B., Verreet, J. A., & Beyer, M. (2007). Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protection*, *26*, 683–690.
- Liu, X., Yin, Y. N., Wu, J. B., Jiang, J. H., & Ma, Z. H. (2010). Identification and characterization of carbendazim-resistant isolates of *Gibberella zeae*. *Plant Disease*, *94*, 1137–1142.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, *90*, 29-92.
- Madden, L. V, & Paul, P. A. (2011). Meta-analysis for evidence synthesis in plant

pathology: An overview. *Phytopathology*, 101,16-30.

Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24, 853–863.

McMullen, M. P., Bergstrom, G. C., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D. E., Shaner, G., & Van Sanford, D. A. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*, 96, 1712-1728.

McMullen, M. P., Jones, R., & Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley - A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81, 1340-1348.

Paul, P. A., Lipps, P. E., Hershman, D. E., McMullen, M. P., Draper, M. A, & Madden, L. V. (2008). Efficacy of triazole-based fungicides for Fusarium head blight and deoxynivalenol control in wheat: a multivariate meta-analysis. *Phytopathology*, 98, 999–1011.

Spolti, P., B.C., J., & Del Ponte, E. M. (2012). Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. *Tropical Plant Pathology*, 37, 419–423.

Spolti, P., & Del Ponte, E. M. (2013). Agressividade diferencial de espécies do complexo *Fusarium graminearum* em interação com o fungicida tebuconazole na redução do rendimento de trigo. *Ciência Rural*, 43, 1569–1575.

Spolti, P., Del Ponte, E. M., Dong, Y., Cummings, J. A., & Bergstrom, G. C. (2014). Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Disease*, 98,

607–613.

Tralamazza, S. M., Bemvenuti, R. H., Zorzete, P., De Souza Garcia, F., & Correia, B. (2016). Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. *Food Chemistry*, *196*, 445–456.

Wegulo, S. N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, *4*, 1157–1180.

Yin, Y., Liu, X., Li, B., & Ma, Z. (2009). Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology*, *99*, 487–497.

Zhang, L., Jia, X., Chen, C., & Zhou, M. (2013). Characterization of carbendazim sensitivity and trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in Jiangsu province of China. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *84*, 53–60.

## ARTIGO 1

### **Caracterização da resistência a tebuconazol e carbendazim para o complexo de espécies *Fusarium graminearum* associado à giberela do trigo no sul do Paraná**

Franklin J. Machado, Cleiltan N. Silva, Dauri J. Tessmann, Eduardo S. G. Mizubuti,  
Emerson M. Del Ponte

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n,  
36570-000, Viçosa, MG, Brasil

#### **Resumo**

Os fungicidas são a principal ferramenta disponível para reduzir o risco de danos e de contaminação por micotoxinas na cultura do trigo por epidemias de giberela. Ensaio de campo foram conduzidos em 16 municípios na região de Guarapuava, Sul do Paraná, durante quatro anos (2011 a 2014). Desses, 227 isolados semelhantes a espécies do complexo de espécies de *Fusarium graminearum* foram obtidos a partir de espigas de trigo sintomáticas coletadas nas parcelas. Uma sub amostra de 173 isolados foi analisada quanto ao genótipo tricoteceno com base em ensaios de PCR. Entre eles, 67% foram identificados como 15-(A)cetil-desoxinivalenol (DON), 29% nivalenol (NIV) e 4% 3-ADON. Uma amostra de 35 isolados foi selecionada para determinar a concentração dos fungicidas tebuconazol e carbendazim que reduz em 50% do crescimento de micelial ( $EC_{50}$ ), usando as seguintes doses (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{g/ml}$ ). As médias estimadas de  $EC_{50}$ , independente do genótipo, foram 0,39  $\mu\text{g/ml}$  (0,0004 a 3,0) e 1,25  $\mu\text{g/ml}$  (0,91 a

2,65) para tebuconazol e carbendazim, respectivamente. As médias de EC<sub>50</sub> foram 1,32 µg/ml e 1,21 µg/ml para carbendazim e 0,58 µg/ml e 0,05 µg/ml para tebuconazol, para os isolados 15-ADON e NIV ou 3-ADON, respectivamente. O teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov mostrou diferença nas distribuições de EC<sub>50</sub> para tebuconazol entre isolados 15-ADON e NIV+3-ADON ( $P = 0,002$ ), mas não para o carbendazim ( $P = 0,514$ ). As doses discriminatórias de 1,4 µg/ml e 2,0 µg/ml foram usadas para identificar isolados menos sensíveis em toda coleção. Baseado nessas doses, dois isolados menos sensíveis ao tebuconazol e seis isolados menos sensíveis ao carbendazim foram encontrados, sendo todos originários do município de Guarapuava, de três safras diferentes, e tendo o genótipo 15-ADON. Houve correlação significativa entre os valores de EC<sub>50</sub> dos dois fungicidas ( $r = 0,45$ ;  $P = 0,007$ ). Um isolado apresentou os maiores valores de EC<sub>50</sub> para ambos fungicidas e uma mutação (R31K) no gene *cyp51A*. A presença de reduzida sensibilidade e um isolado resistente reportado pela primeira vez no Brasil sugerem a possibilidade de seleção nas populações como consequências do uso de fungicidas. Estudos futuros devem se concentrar em atributos de fitness, competitividade e experimentos *in vivo* para verificar se a eficácia do fungicida é prejudicada na presença de isolados menos sensíveis.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, *Fusarium graminearum*, *Gibberella zeae*, controle químico

## **Introdução**

A giberela é uma das doenças mais destrutivas do trigo e representa uma ameaça não somente à produção agrícola, mas principalmente à segurança alimentar e saúde animal (McMullen et al. 2012). A doença é causada por um complexo de espécies (FGSC, *F.*

*graminearum* species complex), onde pelo menos cinco espécies foram relatadas associadas à giberela em cereais de inverno no Brasil (Astolfi et al. 2011; Del Ponte et al. 2015). No entanto, a espécie dominante (>85%) em trigo no sul do Brasil é *F. graminearum*, seguida de *F. meridionale*, que tem maior prevalência (ao redor 30%) no estado do Paraná (Del Ponte et al. 2015). Implicações toxicológicas são esperadas já que a primeira produz o tricoteceno deoxinivalenol (DON) e a segunda nivalenol (NIV, Del Ponte et al., 2015), a qual apresenta maior toxicidade que DON (Minervini et al. 2004).

Os sintomas típicos da doença incluem a senescência prematura das espigas, com danos físicos nos grãos, do que resultam danos no rendimento estimados em até 23% (Casa et al. 2004). Danos na produtividade devido à giberela no Brasil em um período de mais de duas décadas (1984 a 2010) foram estimados em média de 18,62%, mas com grande variação entre os anos (Casa et al., 2011). Na década de 1970 e 1980 a doença era considerada de importância secundária em termos de danos na produtividade (Casa et al. 2011). No entanto, epidemias se tornaram mais frequentes a partir da década de 1990 no Brasil, assim como ao redor do mundo, em função de variações ou alterações nos padrões climáticos e ampla adoção de práticas conservacionistas de manejo do solo, tal como o plantio direto (Del Ponte et al. 2009; McMullen et al. 1997; McMullen et al., 2012). Por esse motivo, a giberela é considerada doença re-emergente na cultura do trigo a partir da década de 1990 (Del Ponte et al. 2009) com relatos mais recentes de DON e NIV em grãos de lavouras comerciais no Brasil (Del Ponte et al. 2012).

Medidas legislativas, como o estabelecimento de limites máximos de tolerância para micotoxinas de *Fusarium*, incluindo deoxinivalenol e zearalenona, foram implementadas no Brasil (ANVISA, 2011), o que aumenta a importância do problema para a cadeia do trigo. Assim, o manejo da giberela visa atender primariamente a legislação vigente, além da prevenção de danos na produtividade. Dentre as práticas de

manejo, a aplicação de fungicidas é a mais utilizada, sendo atualmente considerada a principal medida para controlar giberela em trigo e micotoxinas, juntamente com o uso de cultivares com menor suscetibilidade (Paul et al. 2008; McMullen et al. 2012; Wegulo 2012; Gilbert & Haber 2013). Desde 2011, ensaios cooperativos de avaliação de fungicidas vêm sendo conduzidos no Brasil (Santana et al. 2012; Santana et al. 2014; Santana et al. 2015). Assim como estudos em outros países, a eficácia de controle da giberela se mostra variável entre e dentro os princípios ativos, com resultados inconsistentes e com níveis, às vezes, aquém do desejado. As razões para a relativa baixa eficácia envolvem a desuniformidade dos perfilhos, a dificuldade de deposição das gotas nas anteras e atraso na aplicação devido às condições climáticas (Deuner et al., 2011).

Dentre os fungicidas mais eficazes para controlar giberela e reduzir níveis de DON na cultura do trigo, destacam-se os do grupo dos triazóis e triazolintiona (DMI - inibidores da demetilação), os quais são os mais recomendados para o controle da doença no mundo (Blandino et al. 2006; Paul et al. 2008; Chen et al. 2012; Willyerd et al. 2012).

As indicações técnicas para a cultura do trigo no sul do Brasil sugerem que, sob condições favoráveis à giberela, duas aplicações de triazóis (propiconazol, epoxiconazol e tebuconazol) ou pré-misturas de dois dos triazóis com uma de duas estrobilurinas (trifloxistrobina + tebuconazol e piraclostrobin + metconazol) podem ser feitas. A primeira aplicação deve ser realizada no florescimento e a segunda até 15 dias após a primeira (Informações..., 2014). Em lavouras altamente tecnificadas com alto potencial produtivo em regiões de risco e histórico da doença, como as regiões tritícolas do sul do Paraná, duas ou mais aplicações de fungicidas têm sido realizadas visando o controle da giberela e redução dos níveis de micotoxinas (Dauri Tessmann, comunicação pessoal).

Os triazóis e os benzimidazóis, especialmente o carbendazim, são usados no Brasil desde 1990 e 1981 (Deuner et al. 2011) respectivamente. Pré-misturas comerciais de

estrobilurinas (inibidores da quinona, QoI) e triazóis têm sido usadas visando o controle concomitante de giberela e manchas foliares (Casa et al. 2007; Spolti et al. 2013). Aplicações de piraclostrobina em mistura com epoxiconazol (Chen et al. 2012) ou metconazol (Spolti et al. 2013) controlaram a doença de maneira mais eficaz do que aplicações de carbendazim e metconazol isoladamente, na China e no Brasil, respectivamente. Na América do Norte e Europa, estrobilurinas não são recomendadas devido relatos de aumento de DON quando aplicadas após a antese, especialmente para azoxistrobina (Wegulo 2012).

Com a intensificação do uso de fungicidas no manejo de doenças, aumenta-se o risco da seleção de populações fúngicas resistentes (Lucas et al. 2015). Redução na sensibilidade de FGSC foi relatada para triazol na Europa entre os anos 1987 e 2004 (Klix et al. 2007). No estado de Nova York, foi encontrado um isolado de *F. graminearum* com baixa sensibilidade ao tebuconazol determinada *in vitro* ( $EC_{50} = 8.09 \mu\text{g/ml}$ ), a eficácia de controle desse fungicida foi abaixo de 18% quando esse isolado foi inoculado em plantas de trigo (Spolti et al. 2014). Diferenças na sensibilidade a tebuconazol têm sido verificadas entre as espécies do complexo, sendo que *F. graminearum* foi menos sensível a esse fungicida que *F. meridionale* no Brasil (Spolti et al. 2012a) e que *F. asiaticum* e *F. cortaderiae* no Uruguai (Umpiérrez-Failache et al. 2013).

Informações sobre resistência a fungicidas de FGSC no Brasil, assim como no mundo, são escassas. No Brasil, em um estudo com 50 isolados de *F. graminearum* obtidos de grãos de trigo da região norte do estado do Rio Grande do Sul, todos os isolados foram sensíveis a doses relativamente baixas de tebuconazol ( $EC_{50}$  média =  $0,014 \mu\text{g/ml}$ ) e metconazol ( $EC_{50}$  média =  $0,037 \mu\text{g/ml}$ , Spolti et al. 2012a). Dois outros estudos testaram diversos fungicidas (triazóis, benzimidazóis e estrobilurinas), porém foram utilizados apenas cinco (Avozani et al. 2014b) e dez isolados (Avozani et al. 2014a) de

FGSC. Para benzimidazóis, há relatos de resistência ao carbendazim, na China, onde esse fungicida é bastante usado no manejo da doença (Chen et al. 2007; Qiu et al. 2014).

A resistência aos fungicidas pode estar relacionada com mutações pontuais nos genes que alteram a sequência de aminoácidos no sítio de ação do fungicida (Ma & Michailides 2005; Lucas et al. 2015). Os principais genes e fungicidas nos quais esse mecanismo tem sido demonstrado são o gene da  $\beta$ -tubulina para benzimidazóis, *CYP 51* (14 $\alpha$ -demetilase) para triazóis e o gene mitocondrial *cyt b* (citocromo b) para estrobilurinas para vários fitopatógenos (Ma & Michailides 2005). Mutações pontuais no gene  $\beta_2$ -tubulina em isolados de FGSC conferem alta (F200Y ou F167Y) ou moderada (E198Q) resistência ao carbendazim (Liu et al. 2010). O fungo possui três parálogos do *CYP 51* (Liu et al. 2011), mas mutações pontuais nesse gene não foram observadas em isolados de *F. graminearum* e *F. asiaticum* com baixa sensibilidade ao tebuconazol na China (Yin et al. 2009). Além de mutações pontuais, a resistência a triazóis pode estar relacionada a uma super expressão do gene *CYP 51* (Ma & Michailides 2005) e genes de transportadores ABC (Ammar et al. 2013).

O presente estudo se baseia na hipótese de há resistência a carbendazim e tebuconazol em populações de FGSC no Brasil, especialmente naquelas populações oriundas de regiões com aplicação intensiva de fungicidas. Os objetivos desse estudo foram: i) determinar a sensibilidade de isolados de FGSC coletados de áreas onde têm sido realizadas intensivas aplicações de fungicidas; ii) investigar os mecanismos moleculares associados à resistência aos fungicidas carbendazim e tebuconazol.

## **Material e Métodos**

### **Área de estudo, amostragem e isolamento.**

Espigas de trigo com sintomas de giberela foram coletadas em áreas com aplicações sequenciais de fungicidas na região produtora de trigo de Guarapuava, no sul do Estado do Paraná (Figura 1). As amostragens foram feitas ao longo das safras de cultivo de 2011 a 2014, em visitas realizadas durante o período de enchimento de grãos. No laboratório, grãos sintomáticos foram retirados das espigas e depositados em placas contendo meio semi-seletivo para *Fusarium* (meio Nash-Snyder). Após 7-10 dias, o isolamento foi feito a partir de colônias típicas de FGSC (pigmentação salmão). Um isolado foi obtido por espiga. Posteriormente, cada isolado foi purificado a partir de pontas de hifa e preservados em meio SNA (*Spezieller Nährstoffarmer* ágar, Astolfi et al. 2012; Gomes et al. 2015). Isolados foram selecionados ao acaso de forma a constituir uma população mínima de 20 isolados por ano.

### **Identificação da espécie e determinação dos genótipos tricotecenos**

O DNA genômico dos isolados de FGSC foi extraído a partir do micélio seguindo o protocolo já descrito (Del Ponte et al. 2015). Os genótipos tricotecenos para as formas acetiladas de DON (3-Acetil-DON e 15-ADON) e nivalenol (NIV) foram identificados usando PCR multiplex com base em porções dos genes *Tri3* e *Tri12*, conforme descrito (Ward et al. 2002; Scoz et al. 2009).

### **Estimativa da EC<sub>50</sub> e determinação das doses discriminatórias**

A estimativa da EC<sub>50</sub> (concentração do fungicida que reduz 50% do crescimento micelial) para os fungicidas tebuconazol e carbendazim foi realizada utilizando 35 isolados escolhidos aleatoriamente a partir de um conjunto de 206 coletados nas safras 2011, 2012 e 2013, que foram obtidos primeiramente. Os produtos comerciais Folicur 200 EC (20% de ingrediente ativo[i.a.]; Bayer S/A) e Carbomax 500 SC (50% de i.a.; Nufarm Indústria

química e farmacêutica S/A), foram utilizados para tebuconazol e carbendazim, respectivamente.

A EC<sub>50</sub> foi determinada pelo método de diluição do fungicida em meio de cultura sólido (Becher et al. 2010; Spolti et al. 2014; Lehner et al. 2015). O produto comercial de cada fungicida foi diluído em água destilada estéril até a solução atingir a concentração de 100 mg i.a/L (solução estoque). Alíquotas foram retiradas da solução estoque e adicionadas em meio BDA (batata dextrose ágar) a 45-50 °C. As concentrações testadas para ambos os fungicidas foram: 0 (controle); 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/ml. Dois discos de micélio (6 mm de diâmetro) foram retirados da borda de uma colônia (7 dias a 25 °C) e depositados, de maneira equidistante, em uma placa de petri (90 mm de diâmetro) contendo 15 ml BDA + fungicida (a partir da dose 1,0). Para as doses 0 e 0,5 foi depositado um disco por placa. Em testes preliminares (dados não mostrados), não houve diferença quando foram usados um ou dois discos por placa. Para cada combinação isolado-dose-fungicida, foram usadas duas replicatas. Após 4 dias de incubação a 25 °C no escuro, o diâmetro da colônia foi medido em duas direções perpendiculares usando um paquímetro digital.

Para cada isolado, a EC<sub>50</sub> foi determinada com o ajuste de uma regressão linear entre a porcentagem de inibição [(diâmetro do crescimento radial no controle – diâmetro na dose com fungicida) x 100/diâmetro no controle] e o logaritmo das concentrações do fungicida relativa ao crescimento micelial na dose zero (sem o fungicida). O diâmetro do disco de micélio (6 mm) foi subtraído do diâmetro da colônia (Becher et al. 2010; Liu et al. 2010; Spolti et al. 2014; Lehner et al. 2015).

A dose discriminatória foi estabelecida como aquela capaz de classificar os isolados como menos sensíveis ou sensíveis ao carbendazim ou tebuconazol. A dose discriminatória para tebuconazol foi escolhida com base nos valores mais discrepantes da

distribuição de EC<sub>50</sub> dos 35 isolados. Para o carbendazim, tomou-se inicialmente como base a dose de 1,4 µg/ml usada em estudos na China (Liu et al. 2010), sendo confirmada pela distribuição dos valores de EC<sub>50</sub> dos 35 isolados.

### **Avaliação da sensibilidade aos fungicidas na população total usando as doses discriminatórias**

Com base nas doses discriminatórias, os 227 isolados da coleção foram testados para ambos fungicidas, inclusive os 35 isolados usados anteriormente. Para tal, um disco de micélio (6 mm de diâmetro) foi retirado das margens de uma colônia de sete dias (25 °C) e depositado no centro de uma placa de petri (60 mm de diâmetro) contendo 7 ml de BDA + fungicida na dose discriminatória. Após 3 dias de incubação a 25 °C no escuro, o diâmetro da colônia foi medido em duas direções perpendiculares usando um paquímetro digital. O experimento foi conduzido uma vez. Foram considerados menos sensíveis os isolados em que o diâmetro radial na dose discriminatória superou em 50% o diâmetro no controle, sendo os demais considerados mais sensíveis (S, Russell 2004). Para isolados identificados como menos sensíveis, a EC<sub>50</sub> foi determinada novamente conforme descrito anteriormente.

### **Caracterização molecular da resistência**

Sequências parciais dos genes *CYP51* e *β<sub>2</sub>-tub* de dois isolados menos sensíveis (2536 e 2657) e dois isolados mais sensíveis (3587 e 2795), foram analisadas a fim de detectar mutações associadas a resistência a cada fungicida. Para tal, os isolados foram crescidos em meio YES (2 g de extrato de levedura, 15 g de sacarose para 100 ml de água) por 5 dias a 25 °C. O micélio foi removido, seco em papel filtro e macerado em almofariz com

nitrogênio líquido. O DNA genômico foi extraído a partir do micélio seguindo o protocolo já descrito (Del Ponte et al. 2015).

A PCR foi realizada em volume de 25  $\mu\text{L}$  com 1  $\mu\text{L}$  de DNA ( $\sim 25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (Tabela 1) a 10  $\mu\text{M}$ , 16,9  $\mu\text{L}$  de água e 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão para Taq, 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (0,4 mM cada), 2,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  e 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerase (Kapa Biosystems). Para os primers do *CYP51*, a reação de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, e uma extensão final a 72 °C por 5 min. O fragmento amplificado foi de aproximadamente 1200-pb. Para os primers do  *$\beta_2\text{-tub}$* , a reação de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 40 s, 57 °C por 40 s, 72 °C por 1,5 min, e uma extensão final a 72 °C por 5 min. O fragmento amplificado foi de aproximadamente 1300-pb. A amplificação foi confirmada usando 3  $\mu\text{L}$  do produto de PCR separado por eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH) e sequenciado pela Macrogen Services (Kumchun-ku, Seoul, Korea). As sequências foram editadas com o software DNA Baser Sequence Assembler v4 (Heracle BioSoft, 2013) e alinhadas usando o software MEGA 7.0 (Tamura et al. 2011).

### **Análise estatística**

Estatística descritiva foi utilizada para sumarizar os dados de  $\text{EC}_{50}$ . Análise de correlação de Spearman ( $\alpha = 0,05$ ) foi usada para detectar possível resistência múltipla aos dois fungicidas por meio da relação entre os valores de  $\text{EC}_{50}$  para carbendazim e tebuconazol para 35 isolados. A distribuição dos valores de  $\text{EC}_{50}$  de isolados com genótipo 15-ADON foi comparada com isolados dos genótipos NIV ou 3-ADON, por meio do teste não

paramétrico Kolmogorov-Smirnov ( $P = 0.05$ ). As análises e os gráficos foram feitos no software R (R Core Team 2012).

## **Resultados**

Em função do número de amostras recebidas e sucesso nos isolamentos, foram obtidos 227 isolados, sendo 55 isolados da safra 2011, 60 isolados da safra 2012, 55 isolados da safra 2013 e 21 da safra 2014. Para os 175 isolados com informação sobre o município de origem, 16 municípios foram identificados. De 227 isolados, 173 foram identificados quanto ao genótipo tricoteceno. Desses, 67% apresentaram o genótipo 15-ADON, 29% o genótipo NIV e 4% genótipo 3-ADON (Tabela S1).

Os valores de  $EC_{50}$  para tebuconazol variaram de 0,0004 a 3,0  $\mu\text{g/ml}$ , a média foi 0,39  $\mu\text{g/ml}$  e a mediana foi 0,11  $\mu\text{g/ml}$ , sendo que 50% dos valores estiveram entre 0,05 e 0,41  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 2A). Para carbendazim, a  $EC_{50}$  variou de 0,91 a 2,65  $\mu\text{g/ml}$ , a média foi 1,25  $\mu\text{g/ml}$  e a mediana foi 1,23  $\mu\text{g/ml}$ , sendo que 50% dos valores estiveram entre 1,12 a 1,31  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 2B).

As concentrações de 1,4 e 2,0  $\mu\text{g/ml}$  foram escolhidas como discriminatórias para o carbendazim (Figura 2A) e para o tebuconazol (Figura 2B), respectivamente. Seis isolados foram menos sensíveis ao carbendazim, sendo eles: UEM 2657 ( $EC_{50}=1,56$   $\mu\text{g/ml}$ ), UEM 2655 ( $EC_{50}=1,50$   $\mu\text{g/ml}$ ), UEM 3325 ( $EC_{50}=1,61$   $\mu\text{g/ml}$ ), UEM 2519 ( $EC_{50}=1,48$   $\mu\text{g/ml}$ ), UEM 2536 ( $EC_{50}=2,65$   $\mu\text{g/ml}$ ) e UEM 3248 ( $EC_{50}=1,56$   $\mu\text{g/ml}$ ). Dois isolados foram considerados menos sensíveis ao tebuconazol: UEM 2657 ( $EC_{50}=2,44$   $\mu\text{g/ml}$ ) e UEM 2536 ( $EC_{50}=3,00$   $\mu\text{g/ml}$ ). Todos os isolados menos sensíveis foram coletados em parcelas do município de Guarapuava, e apresentaram o genótipo tricoteceno 15-ADON, exceto os isolados UEM 2519 e UEM 3248, que não têm

informação sobre o genótipo tricoteceno e, para o isolado UEM 2519 que também não tem informação sobre o município de coleta. Esses isolados menos sensíveis foram obtidos nos anos de 2011, 2012 e 2013.

As médias e medianas de  $EC_{50}$  para 15-ADON ( $n = 19$ ) foram de 1,32  $\mu\text{g/ml}$  e 1,23  $\mu\text{g/ml}$  para carbendazim e 0,58  $\mu\text{g/ml}$  e 0,12  $\mu\text{g/ml}$  para tebuconazol. Para NIV + 3-ADON ( $n = 9$ ) foram de 1,21  $\mu\text{g/ml}$  e 1,19  $\mu\text{g/ml}$  para carbendazim e 0,05  $\mu\text{g/ml}$  e 0,10  $\mu\text{g/ml}$  para tebuconazol (Figura 3). O teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov sugere que a sensibilidade a tebuconazol dos isolados 15-ADON e NIV+3-ADON foram amostrados de populações com distribuições diferentes ( $P = 0,002$ ), mas não para o carbendazim ( $P = 0,514$ ).

A análise de correlação mostrou associação positiva entre os valores de  $EC_{50}$  determinados para tebuconazol e carbendazim ( $r = 0,45$ ;  $P = 0,007$ ). Essa análise foi realizada utilizando 35 isolados, incluindo o isolado UEM 2536 que foi resistente aos dois ingredientes ativos (Figura 4).

### **Caracterização molecular da resistência**

Não foi possível amplificar os fragmentos dos dois genes testados para o isolado UEM 2536. Análise da sequência do gene *cyp51A* revelou uma mutação substituindo uma arginina (R) por uma lisina (K) no códon 31 (R31K) no isolado resistente ao tebuconazol (UEM 2657, Figura5). Não foi possível amplificar os fragmentos do gene  $\beta_2\text{-tub}$  para os isolados testados.

### **Discussão**

No presente estudo foi caracterizada a sensibilidade ao tebuconazol e carbendazim em populações de FGSC, oriundas de espigas sintomáticas de trigo da região de Guarapuava no sul do estado do Paraná na região sul do Brasil. Fungicidas do grupo químico dos triazóis, incluindo o tebuconazol, são os mais recomendados para o controle da giberela no mundo (Blandino et al. 2006; Chen et al. 2012; Willyerd et al. 2012). O carbendazim, do grupo químico dos benzimidazóis, vem sendo usado para o controle da giberela há mais de trinta anos na China (Chen et al. 2012), com diversos casos de isolados altamente resistentes a este ingrediente ativo (Chen et al. 2007; Qiu et al. 2014). No Brasil, carbendazim é de uso anterior aos triazóis no manejo da giberela (Deuner et al. 2011) e constitui uma alternativa de mais baixo custo no manejo de doenças do trigo, incluindo a giberela (Dauri Tessmann, comunicação pessoal), porém pouco se sabia até então acerca da sensibilidade dos isolados brasileiros a este fungicida.

Enquanto que um estudo anterior caracterizou a sensibilidade de isolados de FGSC de várias localidades da região norte no estado do Rio Grande do Sul ao tebuconazol e ao metconazol (Spolti et al. 2012a; Spolti et al. 2012b), dados sobre sensibilidade ao carbendazim são escassos. Por exemplo, Avozani et al. (2014b) determinaram a  $EC_{50}$  de apenas cinco isolados de FGCS ao carbendazim e a outros sete ingredientes ativos, inclusive o tebuconazol.

No Brasil, a sensibilidade de FGSC ao carbendazim foi avaliada previamente apenas em cinco isolados coletados em trigo, milho e cevada do Rio Grande do Sul e Paraná, com valores de  $EC_{50}$  variando de 0,02 a 0,14  $\mu\text{g/ml}$  (Avozani et al. 2014b). No presente estudo, a  $EC_{50}$  média para o carbendazim foi superior (1,25  $\mu\text{g/ml}$ ), sendo seis isolados menos sensíveis ao carbendazim (2,64%) com base em dose discriminatória determinada para isolados de FGSC coletados na China.

Isolados de *Fusarium graminearum* com baixa sensibilidade ao tebuconazol foram identificados nos Estados Unidos (Spolti et al. 2014) e na China (Yin et al. 2009). Nos Estados Unidos (Spolti et al. 2014) foram encontrados dois isolados com baixa sensibilidade, com valores de EC<sub>50</sub> de 8,09 µg/ml e 2,46 µg/ml, em uma coleção de cinquenta isolados. No presente estudo apenas dois (0,8%) dos isolados foram identificados como menos sensíveis ao tebuconazol, com EC<sub>50</sub> acima de 2,0 µg/ml. Em um estudo no Uruguai, a EC<sub>50</sub> média em isolados de *F. graminearum* ( $n = 42$ ) foi estimada em 0,29 µg/ml e em *F. asiaticum e cortaderiae* ( $n = 14$ ) foi estimada em 0,61 µg/ml (Umpiérrez-Failache et al. 2013). A EC<sub>50</sub> média para o tebuconazol de uma população de cinquenta isolados oriundos do Rio Grande do Sul foi estimada em 0,0136 µg/ml (Spolti et al. 2012a), bem mais baixa que a encontrada nesse estudo (0,39 µg/ml), não sendo identificado nenhum isolado com EC<sub>50</sub> >2 µg/ml.

A presença de isolados menos sensíveis e a EC<sub>50</sub> média mais alta sugere que o uso intensivo de fungicidas para o controle da giberela na região sul do estado do Paraná, sobretudo triazóis, comparado a população do Rio Grande do Sul (Spolti et al. 2012a), pode estar exercendo seleção para isolados menos sensíveis ao tebuconazol. Assim, é importante o monitoramento da sensibilidade dos isolados oriundos desta região ao longo do tempo, assim como o monitoramento da eficácia de controle dos fungicidas, sobretudo tebuconazol e carbendazim. Até o momento, redução de eficácia de triazóis no controle da giberela não tem sido detectada ou associada à resistência do fungo a fungicidas, mas os estudos na temática são escassos. Para o carbendazim, especialmente na China, tem sido relacionada a menor eficácia de controle a menor sensibilidade do patógeno (Chen et al. 2007).

Foi observado que a média de EC<sub>50</sub> para isolados com genótipo 15-ADON foi superior à média dos isolados NIV + 3-ADON. Isolados de *F. graminearum* apresentaram

uma sensibilidade a tebuconazol vinte vezes maior que *F. meridionale* (Spolti et al. 2012b). No Uruguai, a EC<sub>50</sub> média de *F. asiaticum* e *cortaderiae* (0,61 µg/ml) foi superior à média de *F. graminearum* (0,29 µg/ml, Umpiérrez-Failache et al. 2013). Embora não tenham sido identificadas as espécies apenas os genótipos tricotecenos, assume-se que esses isolados com genótipo 15-ADON sejam da espécie *F. graminearum*. Uma vez que em uma amostragem de mais de duzentos campos no sul do Brasil foram obtidos mais de seiscentos isolados, e todos com genótipos 15-ADON foram identificados como pertencentes a espécie *F. graminearum* sendo a espécie mais prevalente (Del Ponte et al. 2015).

Pela primeira vez no Brasil, dois isolados foram menos sensíveis tanto ao tebuconazol quanto ao carbendazim o que junto com uma correlação significativa entre os valores de EC<sub>50</sub> dos dois fungicidas, sugerem possível resistência múltipla. Na literatura há relatos de isolados resistentes ao tebuconazol e ao procloraz, fungicida do grupo químico imidazol (Yin et al. 2009), bem como resistência cruzada entre tebuconazol e metconazol (Spolti et al. 2012a).

Foi encontrada uma mutação no gene *cyp51A* (R31K) em um isolado com baixa sensibilidade ao tebuconazol. Essa mutação pode estar relacionada a resistência desse isolado ao tebuconazol, uma vez que não está presente no isolado sensível. Outros trabalhos foram conduzidos com o objetivo de encontrar uma possível mutação no gene *CYP51* associada a baixa sensibilidade de isolados a esse princípio ativo. Na China, foram analisadas as sequências do *cyp51A* e *cyp51B* de um isolado de *F. graminearum* altamente resistente ao tebuconazol, mas nenhuma mutação pontual foi encontrada associada a essa resistência (Yin et al. 2009). Várias mutações não-sinônimas foram encontradas nos genes *cyp51A*, *cyp51B* e *cyp51C* de isolados obtidos na Europa, porém não foram correlacionadas com a resistência a propiconazol (Talas & McDonald 2015).

Futuros estudos devem investigar sobre o custo adaptativo para esses isolados com baixa sensibilidade na ausência do fungicida bem como se o controle da giberela é reduzido frente aos isolados menos sensíveis, conforme demonstrado para isolados resistentes nos Estados Unidos (Spolti et al. 2014).

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de estudos de mestrado para o primeiro autor, de Pós-doutorado para o segundo autor e de produtividade em pesquisa para o terceiro, quarto e quinto autores.

### **Referências**

ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 26 fev. 2011. Seção 1, p. 66.

Ammar, G. A., Tryono, R., Doll, K., Karlovsky, P., Deising, H. B., & Wirsal, S. G. R. (2013). Identification of ABC transporter genes of *Fusarium graminearum* with roles in azole tolerance and/or virulence. *PLoS ONE*, 8, 1–13.

Astolfi, P., dos Santos, J., Schneider, L., Gomes, L. B., Silva, C. N., Tessmann, D. J., & Del Ponte, E. M. (2011). Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 197–201.

Astolfi, P., Reynoso, M. M., Ramirez, M. L., Chulze, S. N., Alves, T. C. A., Tessmann,

- D. J., & Del Ponte, E. M. (2012). Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathology*, *61*, 289–295.
- Avozani, A., Reis, E. M., & Tonin, R. B. (2014a). *In vitro* sensitivity reduction of *Fusarium graminearum* to DMI and QoI fungicides, *40*, 358–364.
- Avozani, A., Tonin, R. B., Reis, E. M., Camera, J., & Ranzi, C. (2014b). *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* isolates to fungicides, *40*, 231–247.
- Becher, R., Hettwer, U., Karlovsky, P., Deising, H. B., & Wirsal, S. G. R. (2010). Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology*, *100*, 444–453.
- Blandino, M., Minelli, L., & Reyneri, A. (2006). 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*, *25*, 193–201.
- Casa, R. T., Bogo, A., Moreira, E. N., & Kuhnem Junior, P. R. (2007). Época de aplicação e desempenho de fungicidas no controle da giberela em trigo. *Ciência Rural*, *37*, 1558–1563.
- Casa, R. T., Reis, E. M., Blum, M. M. C., Bogo, A., Scheer, O., & Zanata, T. (2004). Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. *Fitopatologia Brasileira*, *29*, 289–293.

- Casa, R. T. & Kuhnem, P. R. (2011). Danos causados nos hospedeiros, in: Reis, E. M. (Eds). *Seminário sobre giberela em cereais de inverno: coletânea de trabalhos* (p. 73-86). Passo Fundo: Bertier.
- Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S., & Zhou, M. (2007). Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Management Science*, 63,1201–1207.
- Chen, Y., Zhang, A. F., Gao, T. C., Zhang, Y., Wang, W. X., Ding, K. J., et al. (2012). Integrated use of pyraclostrobin and epoxiconazole for the control of Fusarium head blight of wheat in Anhui province of China. *Plant Disease*, 96, 1495–1500.
- Del Ponte, E. M., Fernandes, J. M. C., Pavan, W., & Baethgen, W. E. (2009). A model-based assessment of the impacts of climate variability on Fusarium head blight seasonal risk in Southern Brazil. *Journal of Phytopathology*, 157, 675–681.
- Del Ponte, E. M., Garda-Buffon, J., & Badiale-Furlong, E. (2012). Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chemistry*, 132, 1087–1091.
- Del Ponte, E., Spolti, P., Ward, T., Gomes, L. B., Nicolli, C. P., Kuhnem, P. R., et al. (2015). Regional and field-specific factors affect the composition of Fusarium head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. *Phytopathology*, 105, 246-254.
- Deuner, C. T., Viana, E., De Rossi, R. L. & Camera, J. (2011). Fungicidas indicados pela pesquisa, momento da aplicação e eficiência do controle de giberela na cultura do trigo, in: Reis, E. M. (Eds). *Seminário sobre giberela em cereais de inverno: coletânea de trabalhos* (p. 215-234). Passo Fundo: Bertier.

Gilbert, J., & Haber, S. (2013). Overview of some recent research developments in fusarium head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35, 149–174.

Gomes, L. B., Ward, T. J., Badiale-Furlong, E., & Del Ponte, E. M. (2015). Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. *Plant Pathology*, 64, 980-987.

Informações técnicas para trigo e triticale – safra 2015 / VIII Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale; Gilberto Rocca da Cunha e Eduardo Caierão, editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2014. 229 p.

Klix, M. B., Verreet, J. A., & Beyer, M. (2007). Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protection*, 26, 683–690.

Lehner, M. S., Silva, R. A., Vieira, R. F., Carneiro, J. E. S., Schnabel, G., & Mizubuti, E. S. G. (2015). Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: A thorough using discriminatory dose, EC 50, high resolution melt assessment analysis and description of new point mutation associated with resistance. *Plant Disease*, 99, 1537–1543.

Liu, X., Yin, Y. N., Wu, J. B., Jiang, J. H., & Ma, Z. H. (2010). Identification and characterization of carbendazim-resistant isolates of *Gibberella zae*. *Plant Disease*, 94, 1137–1142.

Liu, X., Yu, F., Schnabel, G., Wu, J., Wang, Z., & Ma, Z. (2011). Paralogous cyp51 genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 113–123.

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The Evolution of Fungicide

Resistance. *Advances in applied microbiology*, 90, 29-92.

Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24, 853–863.

McMullen, M. P., Jones, R., & Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley - A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81, 1340-1348.

McMullen, M. P., Bergstrom, G. C., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D. E., Shaner, G., & Van Sanford, D. A. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*, 96, 1712-1728.

Minervini, F., Fornelli, F., & Flynn, K. M. (2004). Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro*, 18, 21–28.

Paul, P. A., Lipps, P. E., Hershman, D. E., McMullen, M. P., Draper, M. A, & Madden, L. V. (2008). Efficacy of triazole-based fungicides for Fusarium head blight and deoxynivalenol control in wheat: a multivariate meta-analysis. *Phytopathology*, 98, 999–1011.

Qiu, J., Xu, J., & Shi, J. (2014). Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Eastern China. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 811–823.

R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Russell, P. E. (2004). Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. FRAC Monogr. No. 3. Crop Life International, Brussels.

Santana, F. M., Cargnin, A., Seixas, D. S., André, C., Feksa, H. R., Wesp, C., et al. (2014). Eficiência de fungicidas para controle de giberela em trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2012, 5–10.

Santana, F. M., Lau, D., Maciel, J. L. N., Cargnin, A., Seixas, C. D. S., Bassoi, M. C., et al. (2015). Eficiência de fungicidas para controle de giberela em trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2013, 1–12. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107136/1/135-Trigo.pdf>

Santana, F. M., Lau, D., Maciel, J. L. N., Cargnin, A., Seixas, C. D. S., Bassoi, M. C., et al. (2012). Eficiência de fungicidas para controle de giberela em trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2011, 1–12.

Scoz, L. B., Astolfi, P., Reartes, D. S., Schmale, D. G., Moraes, M. G., & Del Ponte, E. M. (2009). Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology*, 58, 344–351.

Spolti, P., B.C., J., & Del Ponte, E. M. (2012a). Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. *Tropical Plant Pathology*, 37, 419–423.

Spolti, P., Barros, N. C., Gomes, L. B., dos Santos, J., & Del Ponte, E. M. (2012b). Phenotypic and pathogenic traits of two species of the *Fusarium graminearum* complex possessing either 15-ADON or NIV genotype. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 621–629.

Spolti, P., Del Ponte, E. M., Dong, Y., Cummings, J. A., & Bergstrom, G. C. (2014). Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Disease*, 98,

607–613.

Spolti, P., Guerra, D. S., Badiale-furlong, E., & Ponte, E. M. Del. (2013). 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*, *38*, 85–96.

Talas, F., & Mcdonald, B. A. (2015). Significant variation in sensitivity to a DMI fungicide in field populations of *Fusarium graminearum*. *Plant Pathology*, *64*, 664-670.

Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T. J., & Vero, S. (2013). 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*, *166*, 135–140.

Ward, T. J., Bielawski, J. P., Kistler, H. C., Sullivan, E., & O'Donnell, K. (2002). Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 9278–83.

Wegulo, S. N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, *4*, 1157–1180.

Willyerd, K. T., Li, C., Madden, L. V., Bradley, C. A., Bergstrom, G. C., Sweets, L. E., et al. (2012). Efficacy and stability of integrating fungicide and cultivar resistance to manage *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat. *Plant Disease*, *96*, 957–967.

Yin, Y., Liu, X., Li, B., & Ma, Z. (2009). Characterization of sterol demethylation

inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology*, 99, 487–497.

## Tabelas

**Tabela 1.** Informações sobre os primers usados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar as regiões dos genes *CYP51* (14 $\alpha$ -demetilase) e  $\beta_2$ -tubulina.

| Primer                 | Fungicida alvo    | Sequência (5' – 3')                              | Características relevantes   | Referência        |
|------------------------|-------------------|--|--|-------------------|
| F51A-F<br>F51A-R       |                   | TTCCAATCTCTTGTGTTTTGCGT<br>TCGGGATGCTAACACAACCTT | Amplificação da sequência completa do gene <i>cyp51 A, B, C</i> de isolados DMI-R e DMI-S de <i>F. asiaticum</i> e <i>F. graminearum</i> |                   |
| F51B-F<br>F51B-R       | Tebuconazol (DMI) | GGTCCGAAAAAAGATGTTTCG<br>ATCATTGCCGTCAGGCATAA    |  | (Yin et al. 2009) |
| F51C-F1<br>F51C-R1     |                   | AGCACGATGGAATCGCTCTA<br>GCTCGGTCTACACATCCATCA    |  |                   |
| Tub2seq-F<br>Tub2seq-R | Carbendazim (MBC) | ACAAACGCACACACACACACA<br>AAGATGGCGGAACAAGCGA     | Amplificação parcial do gene $\beta_2$ -tubulina.  | (Liu et al. 2010) |

**Tabela S1.** Informações para 227 isolados do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC, *Fusarium graminearum* species complex) caracterizados quanto à sensibilidade aos fungicidas tebuconazol e carbendazim obtidos de espigas com sintomas de giberela em lavouras de trigo do estado do Paraná entre os anos de 2011 a 2014.

| Código <sup>a</sup> | Ano  | Município         | Genótipo<br>Tricoteceno <sup>b</sup> | EC <sub>50</sub> / fenótipo<br>Tebuconazol | EC <sub>50</sub> / fenótipo<br>Carbendazim |
|---------------------|------|-------------------|--------------------------------------|--|--|
| UEM-2545            | 2011 | Turvo             | 15-ADON                              | S  | S  |
| <b>UEM-2546</b>     | 2011 | Turvo             | 15-ADON                              | 0,53                                       | 1,38                                       |
| <b>UEM-2551</b>     | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | 0,06                                       | 1,37                                       |
| UEM-2553            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2554            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2555            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2562            | 2011 | Goixim            | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2580            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2628            | 2011 | Candói            | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2636            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2650            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2653            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2654            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| <b>UEM-2655</b>     | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | 0,68                                       | 1,50 / MS                                  |
| UEM-2657            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | 2,44 / MS                                  | 1,56 / MS                                  |
| UEM-2659            | 2011 | Guarapuava        | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2660            | 2011 | Pinhão            | 15-ADON                              | S  | S  |
| <b>UEM-2662</b>     | 2011 | Pinhão            | 15-ADON                              | 1,72                                       | 1,36                                       |
| UEM-2664            | 2011 | Pinhão            | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2665            | 2011 | Pinhão            | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2687            | 2011 | Candói            | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2689            | 2011 | Candói            | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2692            | 2011 | Candói            | 15-ADON                              | S  | S  |
| <b>UEM-2702</b>     | 2011 | Reserva do Iguaçu | 15-ADON                              | 0,10                                       | 1,22                                       |
| UEM-2703            | 2011 | Reserva do Iguaçu | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2705            | 2011 | Reserva do Iguaçu | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2710            | 2011 | Pinhão            | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2713            | 2011 | Pinhão            | 15-ADON                              | S  | S  |
| <b>UEM-2727</b>     | 2011 | Santa M. do Oeste | 15-ADON                              | 0,07                                       | 1,14                                       |
| UEM-2728            | 2011 | Santa M. do Oeste | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2729            | 2011 | Santa M. do Oeste | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2744            | 2011 | Manoel Ribas      | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2745            | 2011 | Manoel Ribas      | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2764            | 2011 | Manoel Ribas      | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2769            | 2011 | Roncador          | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2775            | 2011 | Roncador          | 15-ADON                              | S  | S  |
| UEM-2777            | 2011 | Roncador          | 15-ADON                              | S  | S  |

|                 |      |                  |         |           |           |
|-----------------|------|------------------|---------|-----------|-----------|
| <b>UEM-2781</b> | 2011 | Roncador         | 15-ADON | 0,29      | 1,30      |
| UEM-2792        | 2011 | Roncador         | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2793        | 2011 | Roncador         | 15-ADON | S         | S         |
| <b>UEM-2794</b> | 2011 | Roncador         | 15-ADON | 0,08      | 1,02      |
| UEM-2795        | 2011 | Roncador         | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2802        | 2011 | Roncador         | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2804        | 2011 | Roncador         | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2810        | 2011 | Roncador         | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2812        | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| <b>UEM-2816</b> | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | 1,71      | 1,31      |
| UEM-2818        | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2821        | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2825        | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2830        | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| <b>UEM-2832</b> | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | 0,95      | 1,31      |
| UEM-2840        | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2841        | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2846        | 2011 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2434        | 2012 | Pinhão           | -       | S         | S         |
| UEM-2474        | 2012 | Turvo            | NIV     | S         | S         |
| UEM-2485        | 2012 | Guarapuava       | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-2489        | 2012 | Guarapuava       | 3ADON   | S         | S         |
| UEM-2492        | 2012 | Guarapuava       | -       | S         | S         |
| UEM-2494        | 2012 | Guarapuava       | NIV     | S         | S         |
| UEM-2497        | 2012 | Campina do Simão | 15-ADON | S         | S         |
| <b>UEM-2499</b> | 2012 | Pinhão           | -       | 0,03      | 0,91      |
| UEM-2504        | 2012 | Pinhão           | -       | S         | S         |
| <b>UEM-2514</b> | 2012 | Guarapuava       | -       | 0,13      | 1,25      |
| UEM-2519        | 2012 | Guarapuava       | -       | S         | 1,48 / MS |
| <b>UEM-2536</b> | 2012 | Guarapuava       | 15-ADON | 3,00 / MS | 2,65 / MS |
| UEM-2541        | 2012 | Guarapuava       | -       | S         | S         |
| UEM-2985        | 2012 | -                | -       | S         | S         |
| <b>UEM-2990</b> | 2012 | Pinhão           | NIV     | 0,0004    | 1,23      |
| UEM-3016        | 2012 | Cantagalo        | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-3021        | 2012 | Cantagalo        | NIV     | S         | S         |
| UEM-3025        | 2012 | Turvo            | -       | S         | S         |
| UEM-3028        | 2012 | Turvo            | NIV     | S         | S         |
| UEM-3033        | 2012 | Roncador         | 15-ADON | S         | S         |
| <b>UEM-3038</b> | 2012 | Roncador         | NIV     | 0,003     | 1,35      |
| UEM-3045        | 2012 | Roncador         | -       | S         | S         |
| UEM-3054        | 2012 | Campina do Simão | NIV     | S         | S         |
| UEM-3056        | 2012 | Campina do Simão | NIV     | S         | S         |
| UEM-3061        | 2012 | Campina do Simão | NIV     | S         | S         |
| UEM-3066        | 2012 | Campina do Simão | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-3070        | 2012 | Pinhão           | 15-ADON | S         | S         |
| UEM-3071        | 2012 | Pinhão           | 15-ADON | S         | S         |

|                 |      |                   |         |      |           |
|-----------------|------|-------------------|---------|------|-----------|
| UEM-3072        | 2012 | Pinhão            | 15-ADON | S    | S         |
| <b>UEM-3074</b> | 2012 | Pinhão            | NIV     | 0,10 | 1,28      |
| UEM-3077        | 2012 | Pinhão            | 15-ADON | S    | S         |
| UEM3084         | 2012 | Guarapuava        | NIV     | S    | S         |
| UEM-3086        | 2012 | Guarapuava        | NIV     | S    | S         |
| UEM-3087        | 2012 | Guarapuava        | NIV     | S    | S         |
| UEM-3088        | 2012 | Goixim            | -       | S    | S         |
| UEM-3089        | 2012 | Goixim            | 15-ADON | S    | S         |
| UEM-3093        | 2012 | Goixim            | -       | S    | S         |
| <b>UEM-3097</b> | 2012 | Goixim            | -       | 0,96 | 1,33      |
| UEM-3100        | 2012 | Guarapuava        | NIV     | S    | S         |
| UEM-3103        | 2012 | Guarapuava        | 15-ADON | S    | S         |
| <b>UEM-3145</b> | 2012 | Pinhão            | NIV     | 0,02 | 1,08      |
| <b>UEM-3159</b> | 2012 | Pinhão            | NIV     | 0,04 | 1,36      |
| UEM-3176        | 2012 | Turvo             |         | S    | S         |
| UEM-3178        | 2012 | Turvo             |         | S    | S         |
| UEM-3182        | 2012 | -                 | NIV     | S    | S         |
| UEM-3214        | 2012 | Guarapuava        |         | S    | S         |
| UEM-3242        | 2012 | -                 | NIV     | S    | S         |
| UEM-3248        | 2012 | -                 | -       | S    | 1,56 / MS |
| UEM-3261        | 2012 | -                 | -       | S    | S         |
| UEM-3263        | 2012 | -                 | NIV     | S    | S         |
| UEM-3264        | 2012 | -                 | 15-ADON | S    | S         |
| UEM-3268        | 2012 | -                 | -       | S    | S         |
| <b>UEM-3270</b> | 2012 | -                 | NIV     | 0,05 | 0,97      |
| UEM-3271        | 2012 | -                 | 15-ADON | S    | S         |
| UEM-3276        | 2012 | -                 | NIV     | S    | S         |
| UEM-3279        | 2012 | -                 | 15-ADON | S    | S         |
| UEM-3280        | 2012 | -                 | -       | S    | S         |
| UEM-3285        | 2012 | Guarapuava        | -       | S    | S         |
| UEM-3296        | 2012 | -                 | NIV     | S    | S         |
| UEM-3298        | 2012 | -                 | -       | S    | S         |
| <b>UEM-3307</b> | 2013 | Reserva do Iguaçu | 15-ADON | 0,28 | 1,16      |
| UEM-3311        | 2013 | Reserva do Iguaçu | -       | S    | S         |
| UEM-3316        | 2013 | Reserva do Iguaçu | NIV     | S    | S         |
| <b>UEM-3317</b> | 2013 | Reserva do Iguaçu | 15-ADON | 0,29 | 1,19      |
| UEM-3325        | 2013 | Guarapuava        | 15-ADON | S    | 1,61 / MS |
| UEM-3337        | 2013 | Campina do Simão  | 15-ADON | S    | S         |
| UEM-3338        | 2013 | Campina do Simão  | 3ADON   | S    | S         |
| UEM-3340        | 2013 | Campina do Simão  | NIV     | S    | S         |
| UEM-3341        | 2013 | Campina do Simão  | 3ADON   | S    | S         |
| UEM-3349        | 2013 | Pinhão            | 3ADON   | S    | S         |
| UEM-3356        | 2013 | Pinhão            | -       | S    | S         |
| <b>UEM-3357</b> | 2013 | Teixeira Soares   | -       | 0,03 | 1,12      |
| UEM-3358        | 2013 | Teixeira Soares   | -       | S    | S         |
| UEM-3363        | 2013 | Teixeira Soares   | -       | S    | S         |

|                 |      |                   |         |      |      |
|-----------------|------|-------------------|---------|------|------|
| UEM-3366        | 2013 | Teixeira Soares   | -       | S    | S    |
| UEM-3367        | 2013 | Teixeira Soares   | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3374        | 2013 | Guarapuava        | NIV     | S    | S    |
| <b>UEM-3387</b> | 2013 | Foz do Jordão     | 15-ADON | 0,29 | 1,30 |
| UEM-3389        | 2013 | Foz do Jordão     | NIV     | S    | S    |
| UEM-3391        | 2013 | Foz do Jordão     | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3393        | 2013 | Foz do Jordão     | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3396        | 2013 | Foz do Jordão     | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3398        | 2013 | Foz do Jordão     | 15-ADON | S    | S    |
| <b>UEM-3400</b> | 2013 | Candói            | 15-ADON | 0,21 | 1,16 |
| UEM-3403        | 2013 | Candói            | NIV     | S    | S    |
| UEM-3404        | 2013 | Candói            | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3434        | 2013 | Pinhão            | 15-ADON | S    | S    |
| <b>UEM-3448</b> | 2013 | Pitanga           | 3ADON   | 0,19 | 1,28 |
| UEM-3453        | 2013 | Pitanga           | 3ADON   | S    | S    |
| UEM-3468        | 2013 | Candói            | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3497        | 2013 | Guarapuava        | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3507        | 2013 | Reserva do Iguaçu | NIV     | S    | S    |
| UEM-3515        | 2013 | Goixim            | NIV     | S    | S    |
| UEM-3522        | 2013 | Goixim            | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3523        | 2013 | Goixim            | -       | S    | S    |
| UEM-3524        | 2013 | Goixim            | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3527        | 2013 | Goixim            | NIV     | S    | S    |
| <b>UEM-3576</b> | 2013 | Turvo             | 15-ADON | 0,10 | 1,17 |
| <b>UEM-3577</b> | 2013 | Turvo             | -       | 0,10 | 1,00 |
| UEM-3580        | 2013 | Turvo             | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3583        | 2013 | Turvo             | -       | S    | S    |
| UEM-3587        | 2013 | Turvo             | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3590        | 2013 | Pinhão            | 15-ADON | S    | S    |
| 001-2013        | 2013 | Goixim            | 15-ADON | S    | S    |
| 002-2013        | 2013 | Cantagalo         | NIV     | S    | S    |
| 003-2013        | 2013 | Turvo             | NIV     | S    | S    |
| <b>004-2013</b> | 2013 | Roncador          | 15-ADON | 0,56 | 1,21 |
| 005-2013        | 2013 | Campina do Simão  | -       | S    | S    |
| 006-2013        | 2013 | Campina do Simão  | 15-ADON | S    | S    |
| 007-2013        | 2013 | Goixim            | 15-ADON | S    | S    |
| 008-2013        | 2013 | Goixim            | -       | S    | S    |
| 009-2013        | 2013 | Turvo             | 15-ADON | S    | S    |
| 010-2013        | 2013 | Turvo             | NIV     | S    | S    |
| 011-2013        | 2013 | Turvo             | NIV     | S    | S    |
| 012-2013        | 2013 | Turvo             | NIV     | S    | S    |
| 013-2013        | 2013 | Guarapuava        | NIV     | S    | S    |
| 014-2013        | 2013 | Candói            | 15-ADON | S    | S    |
| <b>015-2013</b> | 2013 | Candói            | 15-ADON | 0,09 | S    |
| 016-2013        | 2013 | Candói            | NIV     | S    | S    |
| 017-2013        | 2013 | Pinhão            | NIV     | S    | S    |

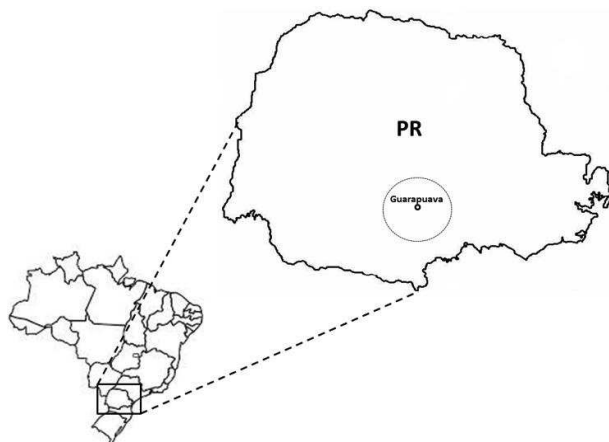
|                 |      |             |         |      |      |
|-----------------|------|-------------|---------|------|------|
| UEM-3674        | 2013 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3675        | 2013 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| <b>UEM-3676</b> | 2013 | -           | 3ADON   | 0,02 | 1,10 |
| UEM-3677        | 2013 | -           | NIV     | S    | S    |
| UEM-3678        | 2013 | -           | -       | S    | S    |
| UEM-3679        | 2013 | -           | NIV     | S    | S    |
| <b>UEM-3680</b> | 2013 | Fomento     | NIV     | 0,04 | 1,27 |
| UEM-3681        | 2013 | -           | NIV     | S    | S    |
| UEM-3682        | 2013 | -           | NIV     | S    | S    |
| UEM-3683        | 2013 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3684        | 2013 | -           | NIV     | S    | S    |
| <b>UEM-3685</b> | 2013 | Candói      | -       | 0,51 | 1,11 |
| UEM-3686        | 2013 | Fomento     | NIV     | S    | S    |
| UEM-3687        | 2013 | Candói      | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3688        | 2013 | Goixim      | -       | S    | S    |
| UEM-3689        | 2013 | Guarapuava  | NIV     | S    | S    |
| UEM-3690        | 2013 | -           | -       | S    | S    |
| UEM-3691        | 2013 | -           | -       | S    | S    |
| UEM-3692        | 2013 | -           | -       | S    | S    |
| UEM-3693        | 2013 | Candói      | -       | S    | S    |
| UEM-3694        | 2013 | Palmeirinha | -       | S    | S    |
| UEM-3695        | 2013 | Guarapuava  | -       | S    | S    |
| UEM-3696        | 2013 | Guarapuava  | -       | S    | S    |
| UEM-3697        | 2013 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| <b>UEM-3698</b> | 2013 | -           | -       | 0,31 | 1,11 |
| UEM-3699        | 2013 | -           | -       | S    | S    |
| UEM-3700        | 2013 | Candói      | -       | S    | S    |
| UEM-3701        | 2013 | Goixim      | NIV     | S    | S    |
| UEM-3702        | 2013 | Candói      | NIV     | S    | S    |
| <b>UEM-3703</b> | 2013 | Candói      | -       | 0,11 | 1,06 |
| UEM-3704        | 2013 | Palmeirinha | -       | S    | S    |
| UEM-3705        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3706        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3707        | 2014 | -           | NIV     | S    | S    |
| UEM-3708        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3709        | 2014 | -           | NIV     | S    | S    |
| UEM-3710        | 2014 | -           | -       | S    | S    |
| UEM-3711        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3712        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3713        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3714        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3715        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3716        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3717        | 2014 | -           | -       | S    | S    |
| UEM-3718        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |
| UEM-3719        | 2014 | -           | 15-ADON | S    | S    |

|          |      |   |         |   |   |
|----------|------|---|---------|---|---|
| UEM-3720 | 2014 | - | 15-ADON | S | S |
| UEM-3721 | 2014 | - | -       | S | S |
| UEM-3722 | 2014 | - | 15-ADON | S | S |
| UEM-3723 | 2014 | - | -       | S | S |
| UEM-3724 | 2014 | - | -       | S | S |
| UEM-3725 | 2014 | - | -       | S | S |

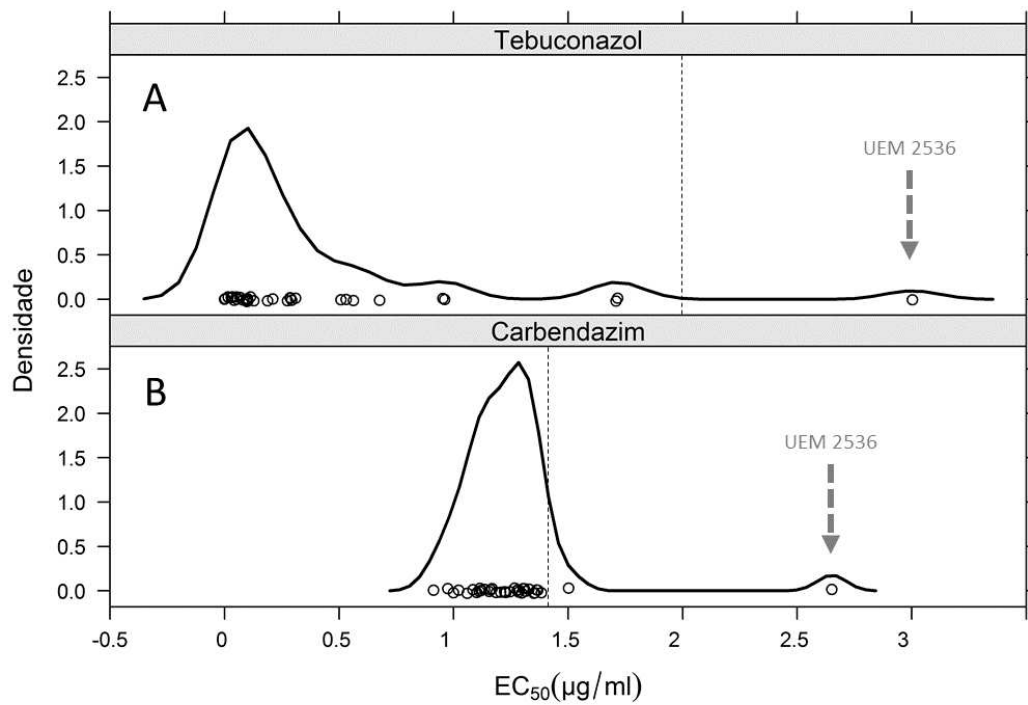
<sup>a</sup> Isolados em negrito foram analisados também quanto à EC<sub>50</sub>, enquanto que os demais foram apenas classificados como menos sensíveis (MS) ou sensíveis (S) com base na dose discriminatória de 1,4 e 2,0 µg/ml para carbendazim e tebuconazol, respectivamente

<sup>b</sup> Genótipo tricoteceno determinado por PCR com primers amplificando sequências parciais dos genes *Tri3* e *Tri12* (Ward et al, 2002). NIV = nivalenol, DON = deoxinivalenol, 3-ADON = 3-acetildeoxinivalenol, 15-ADON = 15-acetildeoxinivalenol.

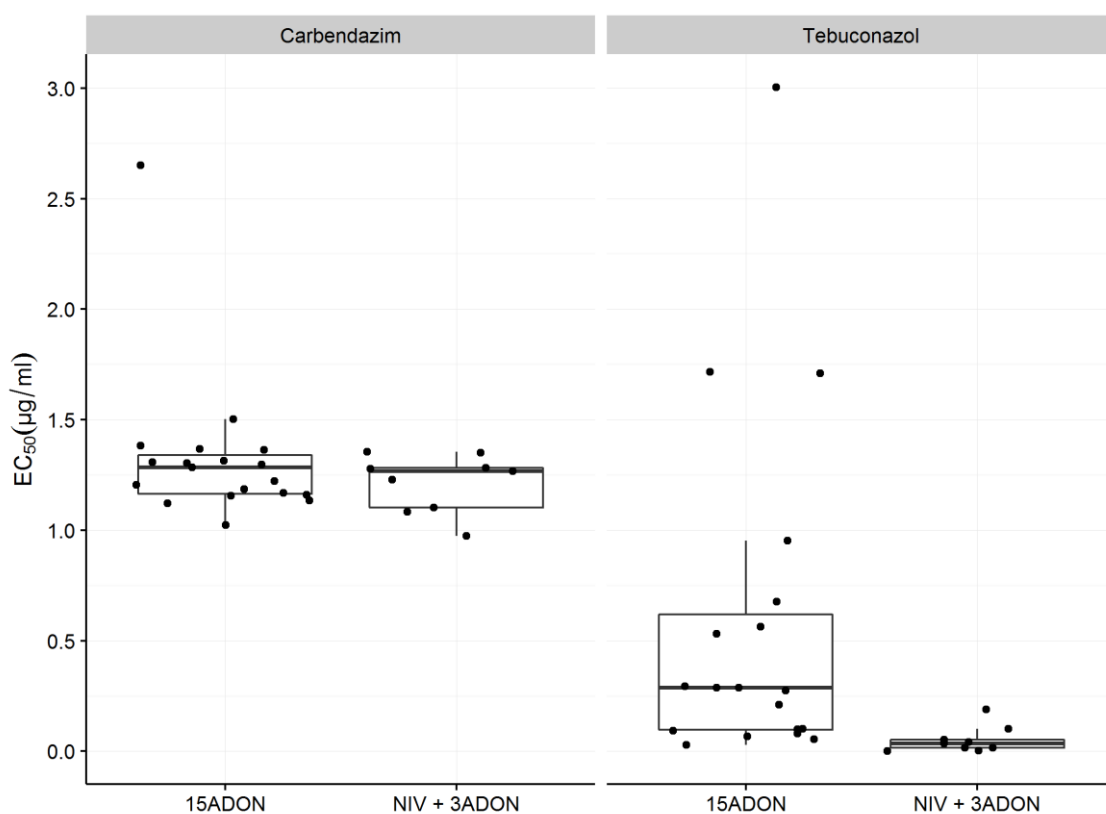
## Figuras



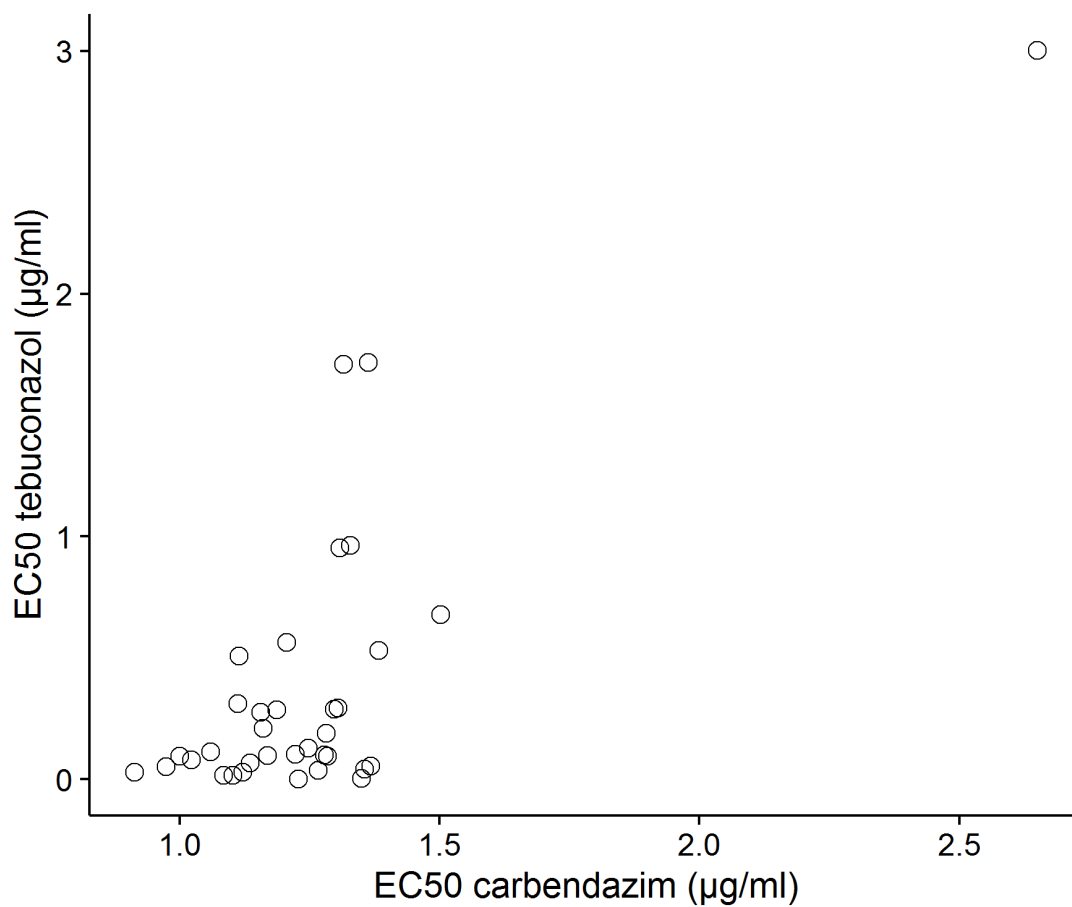
**Figura 1.** Região produtora de trigo do município de Guarapuava no sul do Estado do Paraná.



**Figura 2.** Densidade da frequência da concentração efetiva de, **A**, tebuconazol e **B**, carbendazim que reduz em 50% o crescimento micelial ( $EC_{50}$ ) de 35 isolados do complexo de espécies *Fusarium graminearum* do Paraná, Brasil. As linhas verticais pontilhadas representam as doses discriminatórias para cada fungicida e as setas indicam os valores médios de  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) para o isolado menos sensível a tebuconazol e carbendazim.



**Figura 3.** Box-plot e valores observados da concentração efetiva de tebuconazol e carbendazim, que reduz em 50% o crescimento micelial ( $EC_{50}$ ) de 28 isolados do complexo de espécies *Fusarium graminearum* do Paraná, Brasil, possuindo o genótipo tricoteceno 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON;  $n = 19$ ), nivalenol (NIV) ou 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON;  $n = 7 + 2$ ). A linha dentro da caixa representa a mediana, enquanto que as linhas do topo e do fundo das caixas representam os percentis 75 e 25% dos dados, respectivamente. As barras verticais que se estendem além das caixas representam os percentis 10 e 90% e os pontos fora desse intervalo indicam *outliers*.



**Figura 4.** Relação entre os valores da concentração efetiva de tebuconazol e carbendazim, que reduz em 50% o crescimento micelial ( $EC_{50}$ ) de 35 isolados do complexo de espécies *Fusarium graminearum* do Paraná, Brasil, ao longo dos anos de 2011 a 2014.

```

HN8-R  M F H L L I Y P L W V L V A L F A V I I A N L L Y Q Q L P R R P D E P P L V F H W F P F F G N A V A Y G L D P C G F F E
NX3-S  . . . . .
2657-R . . . . . K . . . . .
3587-S . . . . .
2795-S . . . . .

```

**Figura 5.** Alinhamento dos aminoácidos de parte da sequência do gene *cyp51A* dos isolados de *Fusarium graminearum* HN8 (DMI-R) e NX2 (DMI-S) da China e UEM2657 (isolado resistente ao tebuconazol), UEM3587 e UEM2795 (isolados sensíveis ao tebuconazol) do Paraná, Brasil.

## ARTIGO 2

### **Eficácia de fungicidas no manejo da giberela do trigo no Brasil: revisão sistemática e metanálise**

Franklin J. Machado & Emerson M. Del Ponte

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n,  
36570-000, Viçosa, MG Brasil

#### **Resumo**

Os fungicidas são normalmente aplicados para o manejo da giberela, com o objetivo de garantir a produtividade e melhorar a qualidade dos grãos, visando, especialmente, a redução de micotoxinas. Vários ingredientes ativos estão disponíveis no Brasil, sendo que os mais comuns pertencem ao grupo dos inibidores da demetilação (DMI) e benzimidazóis (MBC), ou usados em mistura com fungicidas do grupo das estrobilurinas (QoI). Dada a importância crescente de epidemias de giberela no Brasil, o uso de fungicidas vem aumentando consideravelmente e, geralmente, duas aplicações são recomendadas. No entanto, os resultados sobre a eficácia têm sido inconsistentes e variáveis para um mesmo fungicida. Uma síntese quantitativa dos dados de eficácia dos fungicidas disponíveis no país é ausente e poderia ser útil para apontar para os produtos mais eficazes e cenários onde a eficácia pode ser melhorada. Os objetivos deste trabalho foram a) revisar sistematicamente estudos de controle químico para o manejo da giberela realizados no Brasil durante os últimos 15 anos, publicados em revistas com e sem corpo editorial e b) realizar uma metanálise da eficácia de controle e retorno em produtividade

de fungicidas selecionados. Uma busca na literatura identificou 18 estudos que relataram a severidade da giberela (o mesmo que o índice giberela) para pelo menos um tratamento com fungicida em comparação com um tratamento controle sem o fungicida, e também uma medida da variância amostral do ensaio. Apenas três e dois estudos relataram valores médios de grãos giberelados e deoxinivalenol (DON), respectivamente. Os estudos foram analisados e oito tratamentos com fungicidas, com pelo menos dez entradas foram selecionados para o estudo de metanálise. Foram incluídos os tratamentos com os fungicidas dos grupos: DMI (tebuconazol, metconazol e propiconazol) e MBC (carbendazim) formulados individualmente e uma pré-mistura de DMI + QoI (azoxistrobina + tebuconazol, piraclostrobina + metconazol, trifloxistrobina + prothioconazol e trifloxistrobina + tebuconazol). Foram testadas uma aplicação ( $\times 1$ ) e duas aplicações ( $\times 2$ ), sendo a primeira na floração plena e a segunda dez dias após a primeira. Um modelo metanalítico multivariado foi ajustado para o log das médias para cada fungicida e o tratamento controle de cada ensaio. A diferença nas estimativas médias do log da severidade entre um tratamento com fungicida e o controle foram usadas para calcular a razão de resposta média ( $R$ ) e então transformadas para porcentagem de controle ( $C$ ) e porcentagem de retorno em produtividade ( $P$ ). A média de  $C$  e  $P$  variou de 48,94 a 70,39% e de 7,41 a 21,29%, respectivamente. Metconazol ( $\times 2$ ) teve o melhor desempenho para reduzir a severidade da doença ( $C = 70,39\%$ ) e tebuconazol ( $\times 1$ ) em retorno em produtividade ( $P = 21,29\%$ ). Propiconazol foi o menos eficaz entre os DMIs ( $C = 48,94\%$ ), seguido de carbendazim ( $C = 53,90\%$ ). Em geral, os fungicidas mais eficazes resultaram em maior retorno de rendimento. Quando os grupos de fungicidas foram comparados, em geral, os DMIs e as misturas tiveram o melhor desempenho, especialmente em ensaios conduzidos sob elevada pressão da doença ( $> 7\%$  no tratamento controle). Os resultados mostraram que a eficácia de controle média em estudos

brasileiros quando se utiliza duas aplicações são mais elevadas do que quando se utiliza apenas uma aplicação, como relatado em outro estudo de metanálise na América do Norte. Estudos futuros deverão centrar-se no efeito sobre os níveis de DON, especialmente para as misturas, que estão estrategicamente utilizadas para o controle de doenças foliares.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, *Fusarium graminearum*, *Gibberella zeae*, controle químico

## **Introdução**

A giberela do trigo, causada pelo complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC, *Fusarium graminearum* species complex), é uma das principais doenças do trigo no mundo (McMullen et al., 2012). O sintoma típico é a senescência prematura de parte ou toda a espiga, com danos físicos resultando em grãos mal formados, com massa reduzida e contaminados com micotoxinas produzidas pelo fungo no processo infeccioso (McMullen et al. 2012). No Brasil, a giberela em trigo e cevada tem aumentado em importância devido a maior frequência com que epidemias tem ocorrido a partir da década de 1990, possivelmente devido à variabilidade climática e intensificação de práticas conservacionistas de manejo do solo que contribuem para o aumento do inóculo (Del Ponte et al. 2009). Estudos de levantamento em lavouras comerciais têm mostrado a presença de micotoxinas produzidas por FGSC, especialmente os tricotecenos deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV), e a zearalenona (ZEA), eventualmente em níveis preocupantes em grãos de trigo produzidos no Brasil (Calori-Domingues et al. 2007; Del Ponte et al. 2012; Tralamazza et al. 2016). Em conformidade com os principais países produtores de trigo no mundo visando garantir a segurança alimentar, medidas

legislativas têm sido adotadas para regular limites máximos de tolerância de DON e ZEA (ANVISA, 2011), o que aumenta a importância do problema para a cadeia produtiva do trigo no Brasil. Assim, a preocupação com a giberela tem aumentado também com a demanda de mercados que exigem maior qualidade do produto, tal como os de farinhas para produtos infantis. Para o manejo da doença, o produtor tem como medidas mais efetivas e viáveis o uso de cultivares menos suscetíveis e aplicações de fungicidas durante o florescimento da cultura (Wegulo et al. 2011; Gilbert & Haber 2013). Dentre os fungicidas mais usados, destacam-se os DMIs (grupo: inibidores da demetilação) formulados tanto individualmente quanto em misturas dos grupos químicos triazol ou triazolintiona (Paul et al. 2008). Misturas de triazóis com fungicidas do grupo químico das estrobilurinas não têm sido recomendadas para o controle de giberela nos Estados Unidos, uma vez que existem relatos de aumento de DON quando são aplicadas após o espigamento (Wegulo 2012). Além desses, benzimidazóis, como o carbendazim, são usados para o controle de giberela na Europa, Ásia e América do Sul (Mesterházy et al. 2003; Chen et al. 2007; Santana et al. 2012).

No Brasil, carbendazim vem sendo utilizado a mais de três décadas (primeiro uso em 1981) no controle da giberela (Deuner et al. 2011). A partir da década de 1990, com o surgimento de novas moléculas, os DMIs passaram a ser também avaliados e recomendados para o controle da giberela no Brasil (Deuner et al., 2011). As indicações técnicas da cultura do trigo no sul do Brasil (Informações... 2014) sugerem que sob condições favoráveis à doença, duas aplicações podem ser feitas (primeira no florescimento e a segunda 15 dias após) de triazóis (propiconazol, epoxiconazol e tebuconazol) e pré-misturas de dois dos triazóis com uma de duas estrobilurinas (trifloxistrobina + tebuconazol e piraclostrobina + metconazol). As pré-misturas são uma opção para situações de necessidade de controle concomitante de manchas foliares que

ocorrem após o florescimento (Casa et al. 2007; Spolti et al. 2013). O carbendazim tem sido considerado uma opção no manejo da giberela especialmente por questões econômicas, já que apresenta menor custo relativo aos demais (Sun et al. 2014).

Em uma revisão narrativa do manejo da giberela com fungicidas no Brasil (Deuner et al. 2011) foi relatada a avaliação de dezenove produtos (ou combinação de produtos) para ensaios conduzidos entre os anos 1982 e 2009. A partir da safra 2011, ensaios cooperativos vêm sendo conduzidos por uma rede de pesquisadores no sul do Brasil visando avaliar um mesmo conjunto de fungicidas com métodos padronizados para a condução dos ensaios e avaliação da doença (Santana et al. 2012; Santana et al. 2014; Santana et al. 2015). Corroborando estudos em outros países, a eficácia de controle da giberela se mostra variável entre e dentre os princípios ativos, com resultados inconsistentes e com níveis, às vezes, aquém do desejado. As razões para a relativa baixa eficácia envolvem a desuniformidade dos perfilhos, a dificuldade de deposição das gotas nas anteras e atraso na aplicação devido às condições climáticas (Deuner et al., 2011). Uma síntese quantitativa dos dados de eficácia dos fungicidas disponíveis no país é ausente e poderia ser útil para apontar para os produtos mais eficazes e cenários onde a eficácia pode ser melhorada.

A metanálise é uma técnica estatística de análise de dados extraídos de estudos selecionados por meio de procedimentos objetivos (Borenstein et al. 2009). Esses resultados são então resumidos através de análise estatística com o objetivo de diminuir a subjetividade dos métodos tradicionais de revisão narrativa. A técnica vem ganhando popularidade na área de fitopatologia e tem sido usada com objetivo de sumarizar a eficácia de tratamentos (fungicidas, antibióticos, agentes de controle biológico, etc.) na supressão da doença ou níveis de micotoxinas, no retorno em produtividade ou mesmo para sumarizar a relações entre variáveis relacionados à doença, como severidade e

produtividade (Madden & Paul 2011). A metanálise pode ser antecedida ou não por revisão sistemática, já que nem sempre os estudos primários tenham sido revistos sistematicamente ou apropriadamente (Borenstein et al., 2009). A revisão sistemática consiste no processo de localizar, de maneira sistemática, os estudos relacionados ao problema de interesse em várias fontes de literatura, seguindo uma série de critérios objetivos de inclusão e exclusão destes estudos, o que permite a reprodutibilidade da pesquisa (Borenstein et al., 2009). Mesmo que os critérios usados na revisão sistemática sejam subjetivos, eles devem ser apresentados de forma clara e transparente (Borenstein et al. 2009).

Na metanálise, a variável central é uma medida que sumariza o tamanho do efeito (do inglês, *effect size*). Na fitopatologia, as medidas de efeito mais comumente estudadas no caso de efeito de tratamentos são o log da razão de resposta, diferença média absoluta ou padronizadas como *d* de Cohen e *g* de Hedges (Ojiambo & Scherm 2006; Madden & Paul 2009; Ngugi et al. 2011a). Os modelos metanalíticos podem ser divididos em univariados ou multivariados em função do número de respostas que são avaliadas de maneira isolada (metanálises separadas para cada variável) ou conjuntamente no mesmo modelo, respectivamente. As vantagens e desvantagens dos dois métodos têm sido motivo de debate na literatura, sendo que diversos autores apontam para a superioridade da análise multivariada ou tratamentos múltiplos (*multi-treatment meta-analysis*), especialmente para casos em que os tratamentos ocorrem simultaneamente no mesmo estudo ou que compartilham um mesmo tratamento testemunha, no caso de se usar a razão de resposta como medida de efeito (Arends et al. 2003; Paul et al. 2008). Na fitopatologia, a análise multivariada tem sido usada em estudos que avaliam múltiplos tratamentos (Paul et al. 2008; Paul et al. 2010; Ngugi et al. 2011b).

Considerando a diversidade de fungicidas que vem sendo avaliada para o controle da giberela e a inconsistência nos resultados, o presente estudo objetivou 1) revisar sistematicamente os estudos sobre controle químico da giberela conduzidos no Brasil nos últimos 15 anos (a partir de 2000) e 2) estimar, por metanálise, a média e a heterogeneidade da eficácia de controle da doença (severidade) e do retorno em produtividade para um conjunto de fungicidas selecionados isoladamente ou agrupados por grupo químico.

## **Material e métodos**

### **Revisão sistemática: busca e critérios de exclusão**

Uma revisão de literatura de estudos de avaliação de fungicidas para o controle da giberela foi feita em fontes diversas, como: revistas científicas com corpo editorial, comunicado ou boletim técnico e resumo expandido de congresso, por meio de consulta a base de dados do Google Scholar (<https://scholar.google.com.br>). Os estudos que atendiam os seguintes critérios foram selecionados: 1) ter um ensaio de campo no Brasil, onde foi avaliado visualmente a intensidade de uma variável de quantificação da doença (incidência, severidade – comumente chamada de índice de giberela, ou seja, a proporção de espiguetas doentes na amostra total de espiguetas, de espigas sintomáticas ou não); 2) ter um tratamento controle (sem aplicação do fungicida) e 3) ter uma medida de variância amostral do ensaio como coeficiente de variação, diferença mínima significativa (DMS) ou teste de comparação múltipla com as discriminação das médias entre os tratamentos, de forma que a DMS pudesse ser estimada (Ngugi et al. 2011b).

Nos estudos que atendiam aos critérios, os tratamentos foram inspecionados e alguns eliminados antes de se proceder a análise. Por exemplo, quando um mesmo

fungicida foi avaliado em diferentes doses, número de aplicações, tipos de pontas de pulverização, doses e etc., apenas o tratamento com dose comercial ou o tratamento com valor próximo à média dos demais foi incluído na metanálise, de forma que se mantivesse apenas uma entrada (média do tratamento por ensaio) do mesmo tratamento por ensaio. Ao final da seleção de todos os tratamentos, aqueles com poucas entradas (< 5 entradas) ou com um grande desbalanço no número de ensaios testando uma ou duas aplicações, por exemplo, foram eliminados, mantendo-se apenas aquela com maior número de ensaios. Após a aplicação destes critérios foram selecionados oito fungicidas em um total de dez tratamentos diferentes, considerando que os fungicidas tebuconazol e metconazol com uma ou duas aplicações para cada e os demais fungicidas com duas aplicações (Tabela 1).

### **Medidas de efeito**

As variáveis de interesse na análise foram a eficácia de controle (percentual de redução) da doença (severidade) e o retorno percentual em produtividade. Na metanálise, por questões de melhores propriedades estatísticas, a medida de efeito usada, para cada variável, foi o logaritmo ( $L$ ) da razão de resposta ( $R$ ) entre os valores de cada variável (severidade ou produtividade) no tratamento com fungicida (T) e no tratamento controle (C). Assim,  $L_{sev}$  e  $L_{prod}$ , são dados por:

$$L_{sev, prod} = \ln(R) = \ln\left(\frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_C}\right) = \ln(\bar{X}_T) - \ln(\bar{X}_C) \quad 1)$$

onde  $L_{sev,prod}$  é o log da razão de resposta ( $R = \bar{X}_T/\bar{X}_C$ ) em que  $\bar{X}_T$  é a média para severidade ou produtividade para um dado tratamento,  $\bar{X}_C$  é a média dessas variáveis para o tratamento controle.  $\ln$  é o logaritmo natural.

### **Modelo metanalítico**

Um modelo multivariado, ao invés de metanálises separadas para cada fungicida, foi utilizado pois vários tratamentos foram avaliados simultaneamente, compartilhando assim a mesma testemunha do ensaio. No modelo multivariado é considerada a matriz de variância-covariância entre estudos e as correlações entre as respostas (Arends et al. 2003; Paul et al. 2008). O modelo é dado por:

$$\mathbf{Y}_i \sim N(\boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\Sigma} + \mathbf{S}_i) \quad (2)$$

onde  $\mathbf{Y}_i$  é o vetor do log da severidade ou produtividade média para os 10 tratamentos mais a testemunha para o  $i$ -nésimo estudo,  $\boldsymbol{\mu}$  é o vetor que representa a média de  $\mathbf{Y}_i$  de todos os estudos,  $\boldsymbol{\Sigma}$  é uma matriz de variância-covariância entre estudos de 11 x 11, e  $\mathbf{S}_i$  é a matriz de variância-covariância intra-estudo para  $i$ -nésimo estudo.  $N(\bullet)$  indica uma distribuição normal multivariada. Os elementos de  $\mathbf{S}_i$  foram incorporados no procedimento de ajuste do modelo como pesos calculados como a função inversa da variância dentro do estudo para cada tratamento de cada estudo (Paul et al. 2008). A matriz  $\boldsymbol{\Sigma}$  foi ajustada com uma estrutura de variância-covariância com simetria composta (CS), simetria composta heterogênea (HCS) e não estruturada (UN), sendo que os modelos cuja convergência foi obtida, foram comparados com base na estatística AIC (*Akaike information criterion*). Os modelos foram ajustados por estimativa da máxima verossimilhança usando o pacote metafor (Viechtbauer 2010) do software R (R Core Team 2012).

Uma vez que  $L_{sev,prod}$  é igual a diferença dos logs (Equação 1), o log da razão de resposta foi estimado como a diferença entre os pares dos elementos em  $\boldsymbol{\mu}$ , bem como o erro padrão e o intervalo de confiança 95%. Assim, a média geral do log da razão de resposta ( $\bar{L}$ ) para cada tratamento relativo ao tratamento controle foi estimada como  $\bar{L} = \hat{\mu}_T - \hat{\mu}_C$ , onde  $\hat{\mu}_T$  e  $\hat{\mu}_C$  são o log da média da severidade ou produtividade estimadas para um tratamento e seu tratamento controle, respectivamente. A eficácia de controle e o

retorno em produtividade e seus intervalos de confiança foram estimados pela transformação inversa do  $\bar{L}_{sev}$  e  $\bar{L}_{prod}$  e o limite superior e inferior do  $\bar{L}_{sev}$  e  $\bar{L}_{prod}$  como  $\bar{C} = (1 - (\exp(\bar{L}_{sev})) \times 100)$  e  $\bar{P} = ((\exp(\bar{L}_{prod}) - 1) \times 100)$ , respectivamente.

A estimativa do efeito dos fungicidas por grupo químico foi feita também com o modelo 2, onde o tratamento foi identificado como pertencendo a um dos três grupos: DMI, MBC ou QoI + DMI. O modelo multivariado para os fungicidas ou grupos de fungicidas foi expandido para avaliar se a heterogeneidade poderia ser explicada por características relacionadas aos estudos. No caso, foi considerado como fator fixo a severidade no tratamento controle em duas categorias, usando o limiar de 7% de severidade na testemunha (Del Ponte et al. 2005; Casa et al., 2003). O modelo misto expandido para considerar o fator fixo pode ser escrito como:

$$Y_i \sim N(\mu + \delta_i, \Sigma + S_i) \quad (3)$$

onde  $\delta_i$  é o efeito da variável moderadora e os outros termos são como descrito na equação 2. O procedimento de ajuste do modelo foi idêntico ao descrito acima e em (Paul et al. 2008).

## **Resultados**

### **Revisão sistemática: características dos estudos**

Dezoito publicações foram identificadas na literatura brasileira. Destas, apenas cinco foram artigos publicados em revistas com corpo editorial e treze em outros tipos de publicação incluindo resumos expandidos, relatórios e boletins técnicos de sumarização de ensaios cooperativos (Tabela S1). Nesses 18 estudos, foram conduzidos 49 experimentos de campo (média de 2,7 ensaios por estudo). Ao todo, foram identificados 36 tratamentos diferentes, sendo aplicados ingredientes ativos individualmente ou em

misturas, números de aplicações, diferentes doses e etc. Os ensaios foram conduzidos em sua maioria no Rio Grande do Sul (69%), seguido do Paraná (27%) e Santa Catarina (4%, Figura 1).

Dos 36 tratamentos, 21 foram excluídos pois se tratavam de combinações de produtos. Outros sete tratamentos foram excluídos por apresentarem poucas entradas (no mínimo cinco entradas), mesmo se tratando de ingrediente ativo aplicado individualmente. Ao final, foram selecionados oito fungicidas para análise (Tabela 1). Desses, foram eliminadas dez entradas que tinham mais de duas aplicações do produto e doze entradas em que a aplicação foi feita antes da antese. Foram mantidas apenas os tratamentos com uma ou duas aplicações do fungicida, totalizando dez tratamentos individuais em 34 ensaios independentes. Após aplicar os critérios de exclusão apresentados anteriormente, onze dessas publicações foram incluídas com 34 ensaios para a severidade e dez publicações com 31 ensaios para a produtividade.

### **Severidade de giberela e produtividade do trigo**

Os valores médios de severidade na testemunha variaram de 0,5 a 62,0% com média de 15,24% e mediana igual a 7,15% (Figura 2A). Em 50% dos ensaios usados na metanálise, a severidade na testemunha variou de 4,36% a 15,80%. Já a produtividade na testemunha variou de 793 a 4.984 kg/ha, com média de 3.000 kg/ha e mediana de 2.993 kg/ha (Figura 2B). Em 50% dos ensaios, a produtividade na testemunha variou entre 2.621 kg/ha e 3.683 kg/ha. A média de produtividade na testemunha foi menor que a média de produtividade em todos os tratamentos, exceto para metconazol aplicado uma ou duas vezes (Figura 2B).

### **Metanálise da eficácia de controle e retorno em produtividade**

Os fungicidas com valores mais negativos de  $\bar{L}_{sev}$ , indicando melhor resposta, foram os metconazol e tebuconazol aplicados isoladamente, seguidos das misturas, e posteriormente, por carbendazim e propiconazol. Os valores de  $\bar{L}_{sev}$  variaram de -1,217 a -0,672, cuja destransformação indica uma eficácia média entre os fungicidas variando de 48,94 a 70,39%. (Tabela 2).

Os fungicidas com os maiores valores de  $\bar{L}_{prod}$ , o que indica melhor retorno, foram o tebuconazol aplicado uma vez e o metconazol aplicado duas vezes, seguidos das misturas, e em seguida, por propiconazol, metconazol e carbendazim aplicados duas, uma e duas vezes, respectivamente. Os valores de  $\bar{L}_{prod}$  variaram de 0,072 a 0,193, em que a destransformação indica um retorno médio em produtividade entre os fungicidas testados variando de 7,41 a 21,29% (Tabela 3).

Quando a estimativa foi feita para os fungicidas em grupos químicos, o grupo das pré-misturas apresentou valor mais negativo de  $\bar{L}_{sev}$ , seguido por triazóis e benzimidazóis. Os valores de  $\bar{L}_{sev}$  variaram de -0,924 a -0,7993, cuja destransformação indica eficácia média variando de 55,01 a 60,32% (Tabela 4).

Da mesma forma, o grupo das pré-misturas apresentou maior valor de  $\bar{L}_{prod}$ , seguido por triazóis e benzimidazóis. Os valores de  $\bar{L}_{prod}$  variaram de 0,077 a 0,134, cuja destransformação indica o retorno médio em produtividade variando de 8,00 a 14,17% (Tabela 5).

No modelo expandido para considerar o efeito da severidade na testemunha, que é um indicativo da “pressão de doença”, foi verificado efeito significativo sobre as medidas de efeito  $\bar{L}_{sev}$  e  $\bar{L}_{prod}$  estimados para os grupos de fungicidas ( $P < 0,001$ ). Os grupos tiveram valores de eficácia de controle (Figura 3A) e retorno em produtividade (Figura 3B) mais variáveis e mais altos quando a severidade na testemunha foi maior que 7% com base na amplitude dos intervalos de confiança 95%.

De maneira geral, há uma relação entre a eficácia de controle e o retorno em produtividade (Figura 4). No entanto, o mais alto retorno em produtividade foi estimado para uma aplicação de tebuconazol, embora não tenha tido a maior eficácia de controle. As pré-misturas apresentaram retorno em produtividade semelhante entre elas, mesmo que a eficácia de controle tenha sido diferente. Os triazóis apresentaram o valor médio de eficácia de controle superior aos demais fungicidas, exceto para o propiconazol aplicado duas vezes, que apresentou a menor eficácia de controle entre todos os tratamentos. Já o carbendazim teve o menor retorno em produtividade, embora com melhor eficácia do que o propiconazol (Figura 4).

## **Discussão**

Foram identificados estudos sobre eficácia de fungicidas no controle da giberela no Brasil nos últimos 15 anos. Somente um terço aproximadamente dos estudos foram publicados em revistas com corpo editorial, sendo a maioria dos ensaios conduzidos a partir do ano de 2011, quando estabeleceu-se uma rede de ensaios cooperativos (Santana et al. 2012; Santana et al. 2014; Santana et al. 2015). As variáveis mais comumente avaliadas nos ensaios foram incidência e severidade em espigas, incidência de grãos giberelados, produtividade, PH (peso hectolítrico) e peso de mil sementes. Na maioria dos estudos, foram avaliadas incidência e severidade como medida da doença, porém no presente trabalho, a severidade foi escolhida por melhor representar a intensidade da doença (Paul et al. 2005). A quantificação de micotoxinas tricotecenos como a deoxinivalenol e/ou nivalenol foi feita em apenas dois estudos (Spolti et al. 2013; Tonin et al. 2015), inviabilizando a análise dessa variável. É possível que esse baixo número de estudos com dados de micotoxinas seja devido ao mais alto custo dessas análises, especialmente para

dados de experimento com delineamento com vários tratamentos e pelo menos quatro repetições. Assim, os dados de micotoxinas são estimados para amostras compostas de um tratamento (sem repetições, Spolti et al. 2013) não permitindo estimar a variância amostral que é necessária na metanálise.

Nos estudos selecionados, um grande número de fungicidas individuais ou em combinação, diferentes doses, números de aplicações, pontas de pulverização e etc, foram avaliados. O grande número de tratamentos de pré-misturas de triazol e estrobilurinas avaliado mais recentemente permite inferir que estejam sendo utilizadas no controle da giberela, uma vez que são recomendadas para esse fim no Brasil (Informações... 2014). Embora o carbendazim não esteja nas indicações técnicas da cultura do trigo para o controle de giberela (Informações... 2014), formulações comerciais com esse princípio ativo continuam sendo avaliadas (Santana et al. 2014; Tonin et al. 2015). Esse fato se deve, principalmente, devido ao menor custo deste produto em relação aos demais usados no controle da doença no Brasil (Dauri Tessmann, comunicação pessoal).

De maneira geral, as médias de eficácia de controle estimadas pelo modelo metanalítico foram mais altas do que estudo similar conduzido com mais de cem ensaios para avaliação de quatro DMIs aplicados isoladamente ou em mistura nos Estados Unidos (Paul et al. 2008). Dentre eles, o propiconazol teve uma eficácia de controle por volta de 30% no estudo americano, enquanto que no presente trabalho, foi encontrada uma eficácia de controle de 48,94%. Essa diferença na eficácia de controle pode estar relacionada ao número de aplicações. No presente estudo, avaliou-se o efeito do propiconazol aplicado duas vezes, enquanto que no estudo americano apenas uma aplicação foi realizada. No entanto, o presente estudo concorda com o estudo americano no sentido que o propiconazol apresentou a pior performance dentre os DMIs. Já para tebuconazol e metconazol aplicados apenas uma vez ao redor da antese, a eficácia de controle média foi

superior à estimada por Paul et al. (2008). A maior eficácia de controle pode ser devida ao mais baixo número de estudos e pelo fato de que os resultados para esses fungicidas serem originados de publicação em revistas com corpo editorial, no caso do Brasil, o que pode apresentar possível viés de publicação para resultados positivos (Madden & Paul 2011). No estudo americano, os dados usados na metanálise foram todos originados de ensaios cooperativos conduzidos ao longo de onze anos.

Metconazol aplicado duas vezes foi superior a uma aplicação, e o tebuconazol em uma aplicação foi superior a duas aplicações, embora essa diferença não tenha sido significativa. Estudos individuais mostraram que uma aplicação adicional de metconazol foi capaz de reduzir a doença, aumentando assim a produtividade (Spolti et al. 2013). Embora esses fungicidas tenham sido mais eficientes, especialmente o metconazol, é necessário que se conduzam mais estudos para estimar com maior confiabilidade os níveis de eficácia de controle, especialmente se uma aplicação adicional resulta em maior retorno.

O fungicida carbendazim aplicado duas vezes teve menor eficácia de controle e menor retorno em produtividade quando comparado com os outros tratamentos. A baixa eficácia de controle da giberela pelo carbendazim tem sido associada na China, ao surgimento de populações de FGSC resistentes a esse fungicida (Chen et al. 2009). Embora Sun et al. (2014) tenha mostrado que o carbendazim foi aplicado duas vezes a eficácia de controle da giberela foi em torno de 80% e de até 87% na redução de DON em dois de experimentos de campo na China. Na Hungria, o carbendazim é o fungicida padrão para o controle de giberela há mais de trinta anos, sendo menos eficaz no controle da doença, com níveis em torno de 30%, enquanto o tebuconazol teve uma eficácia em torno de 60% (Mesterházy et al. 2003). Os autores relatam, ainda, o aumento de DON nas parcelas tratadas com o carbendazim ou azoxistrobina em cultivar suscetível.

Apesar dos triazóis (DMIs) terem o mesmo modo de ação, diferenças na eficácia de controle foram observadas entre os produtos. Algumas das possíveis causas dessas variações vão desde diferenças químicas e físicas das formulações usadas, diferenças inerentes as populações locais do patógenos (por exemplo, sensibilidade aos fungicidas) até interações que envolvem os fungicidas, ambiente, desenvolvimento da cultura e etc. (Paul et al. 2008). De fato, esses ingredientes ativos apresentam diferentes efeitos na germinação de conídios e ascósporos (Klix et al. 2007; Avozani et al. 2014) e crescimento micelial do patógeno (Spolti et al. 2012; Umpiérrez-Failache et al. 2013; Spolti et al. 2014).

Deuner et al. (2011) comentam que a eficácia de controle de giberela é relativamente baixa devido à desuniformidade nos perfilhos, dificuldade de deposição das gotas nas anteras e pelo atraso na aplicação face a limitações das condições climáticas. Embora não tenha sido analisado neste trabalho, a eficácia dos fungicidas no controle da giberela é influenciada pela cultivar usada e condições climáticas, sendo maior em cultivares resistentes do que em cultivares suscetíveis (Mesterházy et al. 2003). Com isso, mais estudos sobre o efeito do nível de resistência da cultivar influenciando a eficácia de controle da giberela, sobretudo, sumarizados por metanálise em condições brasileiras são necessários.

Dentre os grupos, a eficácia de controle e o retorno em produtividade foi maior para QoI + DMI, seguido de DMI e MBC. Em outros países, o uso de estrobilurinas para o controle de giberela não é recomendado (McMullen et al. 2012) já que existem vários relatos de aumento de DON devido à aplicação de QoIs após o espigamento, especialmente para azoxistrobina (Wegulo et al. 2011) e azoxistrobina e carbendazim (Mesterházy et al. 2003). Os resultados obtidos confirmam estudos individuais que mostram que piraclostrobina em mistura com epoxiconazol (Chen et al. 2012) ou

metconazol (Spolti et al. 2013) são mais eficazes para controlar giberela que carbendazim e metconazol isoladamente, na China e no Brasil, respectivamente. Além disso, as misturas podem proporcionar um maior retorno em produtividade, devido ao melhor controle de doenças foliares e por retardar a senescência da folha bandeira (Blandino et al. 2011).

Quando houve maior intensidade de giberela, tanto a eficácia de controle quanto o retorno em produtividade foram mais altos do que em condições menos favoráveis à doença, concordando com os resultados de outra metanálise (Paul et al. 2008).

Assim como para eficácia de controle, as médias de retorno em produtividade estimadas nesse estudo, no geral, foram mais altas do que no conduzido nos Estados Unidos (Paul et al. 2010). Entre os DMIs, a diferença foi de até 50% maior no retorno em produtividade para propiconazol. Já a diferença no caso do tebuconazol e metconazol foi ao redor de 50% (de 9 para 16%, de 14 para 17%, para tebuconazol e metconazol, respectivamente). Tal diferença pode ser devida também a uma aplicação adicional, no caso dos ensaios no Brasil.

Os resultados obtidos fornecem informações úteis no que diz respeito aos fungicidas usados no controle de giberela, tanto com relação à eficácia de controle quanto ao retorno em produtividade. Embora sejam recomendadas duas aplicações dos fungicidas, estudos com relação a viabilidade econômica dessa segunda aplicação são necessários. Esse tipo de estudo, leva em consideração o custo da aplicação e o retorno econômico. Além disso, mais estudos sobre efeito do controle químico na produção de micotoxinas (DON) precisam ser feitos, uma vez são escassos no Brasil. Estudos que relacionam a sensibilidade de isolados de campo com a eficácia de controle podem ser uma boa ferramenta para justificar a adoção do manejo da doença com fungicidas com diferentes modos de ação afim de evitar a seleção de isolados resistentes aos fungicidas.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de estudos de mestrado para o primeiro autor e de produtividade em pesquisa para o segundo autor.

## **Referências**

ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 26 fev. 2011. Seção 1, p. 66.

Arends, L. R., Vokó, Z., & Stijnen, T. (2003). Combining multiple outcome measures in a meta-analysis: An application. *Statistics in Medicine*, 22, 1335–1353.

Avozani, A., Reis, E. M., & Tonin, R. B. (2014). *In vitro* sensitivity reduction of *Fusarium graminearum* to DMI and QoI fungicides, 40, 358–364.

Blandino, M., Pascale, M., Haidukowski, M., & Reyneri, A. (2011). Influence of agronomic conditions on the efficacy of different fungicides applied to wheat at heading: Effect on flag leaf senescence, Fusarium head blight attack, grain yield and deoxynivalenol contamination. *Italian Journal of Agronomy*, 6, 204–211.

Borenstein, M., Hedges, L. V., Higgins, J. P. T. and Rothstein, H. R. (2009). Introduction to Meta-Analysis, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

Calori-Domingues, M. A., Almeida, R. R. De, Tomiwaka, M. M., Gallo, C. R., Micotti, E., Tadeu, C., & Dias, S. (2007). Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e

importado utilizado no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 181–185.

Casa, R.T., Reis, E.M., Scheer, O., Zanatta, T., Cardoso, C. & Bogo (2003). A. Efeito do número de espiguetas gibereladas sobre o rendimento de grãos, peso de mil sementes e incidência de *Fusarium graminearum* em grãos de trigo. *Fitopatologia Brasileira* 28:S384. (Resumo)

Casa, R. T., Bogo, A., Moreira, E. N., & Kuhnem Junior, P. R. (2007). Época de aplicação e desempenho de fungicidas no controle da giberela em trigo. *Ciência Rural*, 37, 1558–1563.

Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S., & Zhou, M. (2007). Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Management Science*, 63,1201–1207.

Chen, Y., Zhang, A. F., Gao, T. C., Zhang, Y., Wang, W. X., Ding, K. J., et al. (2012). Integrated use of pyraclostrobin and epoxiconazole for the control of Fusarium head blight of wheat in Anhui province of China. *Plant Disease*, 96, 1495–1500.

Chen, Y., & Zhou, M. G. (2009). Characterization of *Fusarium graminearum* isolates resistant to both carbendazim and a new fungicide JS399-19. *Phytopathology*, 99, 441–446.

Del Ponte, E. M., Fernandes, J. M. C., & Pavan, W. (2005). A risk infection simulation model for Fusarium head blight of wheat. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 634–642.

Del Ponte, E. M., Fernandes, J. M. C., Pavan, W., & Baethgen, W. E. (2009). A model-based assessment of the impacts of climate variability on Fusarium head blight seasonal risk in Southern Brazil. *Journal of Phytopathology*, 157, 675–681.

Del Ponte, E. M., Garda-Buffon, J., & Badiale-Furlong, E. (2012). Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chemistry*, *132*, 1087–1091.

Deuner, C. T., Viana, E., De Rossi, R. L. & Camera, J. (2011). Fungicidas indicados pela pesquisa, momento da aplicação e eficiência do controle de giberela na cultura do trigo, in: Reis, E. M. (Eds). *Seminário sobre giberela em cereais de inverno: coletânea de trabalhos* (p. 215-234). Passo Fundo: Bertier.

Gilbert, J., & Haber, S. (2013). Overview of some recent research developments in Fusarium head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *35*, 149–174.

Informações técnicas para trigo e triticale – safra 2015 / VIII Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale; Gilberto Rocca da Cunha e Eduardo Caierão, editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2014. 229 p.

Klix, M. B., Verreet, J. A., & Beyer, M. (2007). Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zea* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protection*, *26*, 683–690.

Madden, L. V., & Paul, P. A. (2009). Assessing heterogeneity in the relationship between wheat yield and Fusarium head blight intensity using random-coefficient mixed models. *Phytopathology*, *99*, 850–60.

Madden, L. V., & Paul, P. A. (2011). Meta-analysis for evidence synthesis in plant pathology: An overview. *Phytopathology*, *101*, 16-30.

McMullen, M. P., Bergstrom, G. C., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D. E., Shaner, G., & Van Sanford, D. A. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and

barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*, 96, 1712-1728.

Mesterházy, A., Bartók, T., & Lamper, C. (2003). Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of Fusarium head blight. *Plant Disease*, 87, 1107–1115.

Ngugi, H. K., Esker, P. D., & Scherm, H. (2011a). Meta-analysis to determine the effects of plant disease management measures: review and case studies on soybean and apple. *Phytopathology*, 101, 31–41.

Ngugi, H. K., Lehman, B. L., & Madden, L. V. (2011b). Multiple treatment meta-analysis of products evaluated for control of fire blight in the eastern United States. *Phytopathology*, 101, 512–22.

Ojiambo, P. S., & Scherm, H. (2006). Biological and application-oriented factors influencing plant disease suppression by biological control: a meta-analytical review. *Phytopathology*, 96, 1168–1174.

Paul, P. A., Lipps, P. E., & Madden, L. V. (2005). Relationship between visual estimates of Fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: a meta-analysis. *Phytopathology*, 95, 1225–1236.

Paul, P. A., McMullen, M. P., Hershman, D. E., & Madden, L. V. (2010). Meta-analysis of the effects of triazole-based fungicides on wheat yield and test weight as influenced by Fusarium head blight intensity. *Phytopathology*, 100, 160–171.

Paul, P. A., Lipps, P. E., Hershman, D. E., McMullen, M. P., Draper, M. A., & Madden, L. V. (2008). Efficacy of triazole-based fungicides for Fusarium head blight and deoxynivalenol control in wheat: a multivariate meta-analysis. *Phytopathology*, 98, 999–

1011.

R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Santana, F. M., Cargnin, A., Seixas, D. S., André, C., Feksa, H. R., Wesp, C., et al. (2014). Eficiência de fungicidas para controle de giberela em trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2012, 5–10.

Santana, F. M., Lau, D., Maciel, J. L. N., Cargnin, A., Seixas, C. D. S., Bassoi, M. C., et al. (2015). Eficiência de fungicidas para controle de giberela em trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2013, 1–12. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107136/1/135-Trigo.pdf>

Santana, F. M., Lau, D., Maciel, J. L. N., Cargnin, A., Seixas, C. D. S., Bassoi, M. C., et al. (2012). Eficiência de fungicidas para controle de giberela em trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2011, 1–12.

Spolti, P., B.C., J., & Del Ponte, E. M. (2012). Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. *Tropical Plant Pathology*, 37, 419–423.

Spolti, P., Del Ponte, E. M., Dong, Y., Cummings, J. A., & Bergstrom, G. C. (2014). Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Disease*, 98, 607–613.

Spolti, P., Guerra, D. S., Badiale-Furlong, E., & Ponte, E. M. Del. (2013). 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*, 38, 85–96.

Sun, H. Y., Zhu, Y. F., Liu, Y. Y., Deng, Y. Y., Li, W., Zhang, A. X., & Chen, H. G. (2014). Evaluation of tebuconazole for the management of Fusarium head blight in China. *Australasian Plant Pathology*, 43, 631–638.

Tonin, I., Rosa, A.C., Filho, O. R., Lemes, C., Tonin, R. B., Deon, A. & Pirez, I. V. (2015). Efeito de aplicações extras de fungicidas na fase de florescimento do trigo no rendimento de grãos e níveis de desoxinivalenol. Reunião do trigo.

Tralamazza, S. M., Bemvenuti, R. H., Zorzete, P., De Souza Garcia, F., & Correia, B. (2016). Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. *Food Chemistry*, 196, 445–456.

Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T. J., & Vero, S. (2013). 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*, 166, 135–140.

Viechtbauer, W. (2010). Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *Journal of Statistical Software*, 36, 1-48.

Wegulo, S. N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, 4, 1157–1180.

Wegulo, S. N., Bockus, W. W., Nopsa, J. H., De Wolf, E. D., Eskridge, K. M., Peiris, K. H. S., & Dowell, F. E. (2011). Effects of integrating cultivar resistance and fungicide

application on Fusarium Head blight and deoxynivalenol in winter wheat. *Plant Disease*, 95, 554–560.

## Tabelas

**Tabela 1.** Características dos fungicidas utilizados na metanálise.

| Código <sup>a</sup>       | k <sup>b</sup> | Ingrediente Ativo                    | Produto comercial <sup>c</sup>  | Dose <sup>d</sup><br>(g i.a./ha) | Nome do Grupo <sup>e</sup> |
|---------------------------|----------------|--------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| CARB <sub>2x</sub>        | 19             | Carbendazim                          | Bendazol,<br>Carbendazim Nortox | 375<br>500                       | MBC                        |
| METC <sub>1x</sub>        | 6              | Metconazol                           | Caramba                         | 81                               | DMI                        |
| METC <sub>2x</sub>        | 4              | Metconazol                           | Caramba                         | 81                               | DMI                        |
| PROP <sub>2x</sub>        | 20             | Propiconazol                         | PNR, Propiconazol<br>Nortox     | 187,5                            | DMI                        |
| TEBU <sub>1x</sub>        | 8              | Tebuconazol                          | Folicur                         | 150                              | DMI                        |
| TEBU <sub>2x</sub>        | 9              | Tebuconazol                          | Folicur<br>Alterne              | 150                              | DMI                        |
| AZOX + TEBU <sub>2x</sub> | 20             | Azoxistrobina +<br>Tebuconazol       | PNR                             | 75 + 144                         | QoI + DMI                  |
| PIRA + METC <sub>2x</sub> | 26             | Piraclostrobina +<br>Metconazol      | Opera Ultra                     | 65 + 40<br>97,5 + 60             | QoI + DMI                  |
| TFLX + PROT <sub>2x</sub> | 20             | Trifloxistrobina +<br>Prothioconazol | Fox                             | 75 + 87,5                        | QoI + DMI                  |
| TFLX + TEBU <sub>2x</sub> | 19             | Trifloxistrobina +<br>Tebuconazol    | Nativo                          | 75 + 150                         | QoI + DMI                  |

<sup>a</sup>Fungicidas usados na metanálise com uma (1×) ou duas (2×) aplicações do produto.

<sup>b</sup>Número total de ensaios usados na análise.

<sup>c</sup>Produto comercial usado no ensaio, conforme descrito pelo autor. PNR = produto não registrado.

<sup>d</sup>Doses mais usadas ao longo dos ensaios.

<sup>e</sup>Nome do grupo de acordo com FRAC, 2012.

**Tabela 2.** Log da razão de resposta (medida de efeito), eficácia de controle e estatísticas relacionadas para os efeitos dos fungicidas na severidade da giberela.

| Fungicida <sup>a</sup>    | <i>k</i> <sup>b</sup> | Medida de efeito <sup>c</sup> |                    |            |            | Eficácia de controle (%) <sup>d</sup> |            |            |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------|------------|------------|---------------------------------------|------------|------------|
|                           |                       | $\bar{L}_{sev}$               | E.P. ( $\bar{L}$ ) | $IC_{Inf}$ | $IC_{Sup}$ | $\bar{C}$                             | $IC_{Inf}$ | $IC_{Sup}$ |
| CARB <sub>2x</sub>        | 19                    | -0,774                        | 0,111              | -0,992     | -0,557     | 53,90                                 | 42,71      | 62,91      |
| METC <sub>1x</sub>        | 6                     | -0,959                        | 0,161              | -1,274     | -0,643     | 61,65                                 | 47,42      | 72,04      |
| METC <sub>2x</sub>        | 4                     | -1,217                        | 0,225              | -1,658     | -0,776     | 70,39                                 | 53,98      | 80,94      |
| PROP <sub>2x</sub>        | 20                    | -0,672                        | 0,107              | -0,882     | -0,462     | 48,94                                 | 37,00      | 58,61      |
| TEBU <sub>1x</sub>        | 8                     | -1,176                        | 0,190              | -1,549     | -0,802     | 69,14                                 | 55,17      | 78,75      |
| TEBU <sub>2x</sub>        | 9                     | -1,065                        | 0,188              | -1,434     | -0,696     | 65,52                                 | 50,13      | 76,16      |
| AZOX + TEBU <sub>2x</sub> | 20                    | -0,838                        | 0,110              | -1,052     | -0,623     | 56,72                                 | 46,36      | 65,08      |
| PIRA + METC <sub>2x</sub> | 26                    | -0,978                        | 0,106              | -1,186     | -0,771     | 62,41                                 | 53,75      | 69,44      |
| TFLX + PROT <sub>2x</sub> | 20                    | -0,969                        | 0,112              | -1,188     | -0,751     | 62,05                                 | 52,78      | 69,50      |
| TFLX + TEBU <sub>2x</sub> | 19                    | -0,786                        | 0,111              | -1,003     | -0,569     | 54,44                                 | 43,41      | 63,32      |

<sup>a</sup>Ingredientes ativos: Tabela 1.

<sup>b</sup>Número total de ensaios usados na análise.

<sup>c</sup>Log da razão de resposta média ( $\bar{L}_{sev}$ ) para o efeito de cada fungicida na severidade da giberela em relação ao tratamento controle, erro padrão do  $\bar{L}_{sev}$  (E.P. ( $\bar{L}$ )), limites inferior ( $IC_{Inf}$ ) e superior ( $IC_{Sup}$ ) do intervalo de confiança a 95% do  $\bar{L}_{sev}$ . Houve efeito significativo para todos os tratamentos ( $P < 0,001$ ).

<sup>d</sup>Eficácia média de controle ( $\bar{C}$ ) e limite inferior ( $IC_{Inf}$ ) e superior ( $IC_{Sup}$ ) do intervalo de confiança a 95% do  $\bar{C}$  estimados pela transformação reversa do  $\bar{L}_{sev}$  e dos limites do intervalo de confiança, como  $\bar{C} = (1 - \exp(\bar{L}_{sev})) \times 100$ .

**Tabela 3.** Log da razão de resposta (medida de efeito), retorno em produtividade e estatísticas relacionadas para os efeitos dos fungicidas na produtividade do trigo.

| Fungicida <sup>a</sup>    | <i>k</i> <sup>b</sup> | Medida de efeito <sup>c</sup> |                    |                          |                          | Retorno em produt. (%) <sup>d</sup> |                          |                          |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                           |                       | $\bar{L}_{prod}$              | E.P. ( $\bar{L}$ ) | <i>IC</i> <sub>Inf</sub> | <i>IC</i> <sub>Sup</sub> | $\bar{P}$                           | <i>IC</i> <sub>Inf</sub> | <i>IC</i> <sub>Sup</sub> |
| CARB <sub>2x</sub>        | 19                    | 0,072                         | 0,018              | 0,037                    | 0,106                    | 7,41                                | 3,74                     | 11,21                    |
| METC <sub>1x</sub>        | 6                     | 0,090                         | 0,034              | 0,024                    | 0,156                    | 9,43                                | 2,44                     | 16,90                    |
| METC <sub>2x</sub>        | 4                     | 0,161                         | 0,057              | 0,050                    | 0,273                    | 17,49                               | 5,08                     | 31,35                    |
| PROP <sub>2x</sub>        | 19                    | 0,112                         | 0,017              | 0,079                    | 0,145                    | 11,83                               | 8,18                     | 15,60                    |
| TEBU <sub>1x</sub>        | 8                     | 0,193                         | 0,024              | 0,147                    | 0,239                    | 21,29                               | 15,81                    | 27,03                    |
| TEBU <sub>2x</sub>        | 9                     | 0,149                         | 0,020              | 0,110                    | 0,188                    | 16,05                               | 11,63                    | 20,64                    |
| AZOX + TEBU <sub>2x</sub> | 19                    | 0,122                         | 0,017              | 0,089                    | 0,156                    | 13,00                               | 9,25                     | 16,88                    |
| PIRA + METC <sub>2x</sub> | 23                    | 0,134                         | 0,017              | 0,101                    | 0,167                    | 14,30                               | 10,60                    | 18,11                    |
| TFLX + PROT <sub>2x</sub> | 19                    | 0,125                         | 0,018              | 0,090                    | 0,159                    | 13,28                               | 9,45                     | 17,25                    |
| TFLX + TEBU <sub>2x</sub> | 19                    | 0,125                         | 0,018              | 0,089                    | 0,160                    | 13,26                               | 9,27                     | 17,39                    |

<sup>a</sup>Ingredientes ativos: Tabela 1.

<sup>b</sup>Número total de ensaios usados na análise.

<sup>c</sup>Log da razão de resposta média ( $\bar{L}_{prod}$ ) para o efeito de cada fungicida na produtividade do trigo em relação ao tratamento controle, erro padrão do  $\bar{L}_{prod}$  (E.P. ( $\bar{L}$ )), limites inferior (*IC*<sub>Inf</sub>) e superior (*IC*<sub>Sup</sub>) do intervalo de confiança a 95% do  $\bar{L}_{prod}$ . Houve efeito significativo para todos os tratamentos ( $P < 0,001$ ).

<sup>d</sup>Retorno em produtividade ( $\bar{P}$ ) e limite inferior (*IC*<sub>Inf</sub>) e superior (*IC*<sub>Sup</sub>) do intervalo de confiança a 95% do  $\bar{P}$  estimados pela transformação reversa do  $\bar{L}_{prod}$  e dos limites do intervalo de confiança como,  $\bar{P} = (\exp(\bar{L}_{prod}) - 1) \times 100$ .

**Tabela 4.** Log da razão de resposta (medida de efeito), porcentagem de controle e estatísticas relacionadas para os efeitos dos grupos de fungicidas na severidade da giberela.

| Grupos <sup>a</sup> | <i>k</i> <sup>b</sup> | Medida de efeito <sup>c</sup> |                    |            |            | Eficácia de controle (%) <sup>d</sup> |            |            |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------|------------|------------|---------------------------------------|------------|------------|
|                     |                       | $\bar{L}_{sev}$               | E.P. ( $\bar{L}$ ) | $IC_{Inf}$ | $IC_{Sup}$ | $\bar{C}$                             | $IC_{Inf}$ | $IC_{Sup}$ |
| DMI                 | 32                    | -0,855                        | 0,089              | -1,029     | -0,680     | 57,45                                 | 49,36      | 64,25      |
| MBC                 | 19                    | -0,799                        | 0,109              | -1,013     | -0,584     | 55,01                                 | 44,25      | 63,69      |
| QoI + DMI           | 26                    | -0,924                        | 0,085              | -1,091     | -0,758     | 60,32                                 | 53,14      | 66,40      |

<sup>a</sup>Grupos: Tabela 1.

<sup>b</sup>Número total de ensaios usados na análise.

<sup>c</sup>Log da razão de resposta média ( $\bar{L}_{sev}$ ) para o efeito de cada fungicida (dentro de cada grupo) na severidade da giberela relativo ao tratamento controle, erro padrão do  $\bar{L}_{sev}$  (E.P. ( $\bar{L}$ )), limites inferior ( $IC_{Inf}$ ) e superior ( $IC_{Sup}$ ) do intervalo de confiança a 95% do  $\bar{L}_{sev}$ . Houve efeito significativo para todos os tratamentos ( $P < 0,001$ ).

<sup>d</sup>Eficácia média de controle ( $\bar{C}$ ) e limite inferior ( $IC_{Inf}$ ) e superior ( $IC_{Sup}$ ) do intervalo de confiança a 95% do  $\bar{C}$  estimados pela transformação reversa do  $\bar{L}_{sev}$  e dos limites do intervalo de confiança como  $\bar{C} = (1 - \exp(\bar{L}_{sev})) \times 100$ .

**Tabela 5.** Log da razão de resposta (medida de efeito), retorno em produtividade e estatísticas relacionadas para os efeitos dos grupos de fungicidas na produtividade do trigo.

| Grupos <sup>a</sup> | <i>k</i> <sup>b</sup> | Medida de efeito <sup>c</sup> |                    |            |            | Retorno em produt. (%) <sup>d</sup> |            |            |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------|------------|------------|-------------------------------------|------------|------------|
|                     |                       | $\bar{L}_{prod}$              | E.P. ( $\bar{L}$ ) | $IC_{Inf}$ | $IC_{Sup}$ | $\bar{P}$                           | $IC_{Inf}$ | $IC_{Sup}$ |
| DMI                 | 31                    | 0,130                         | 0,014              | 0,103      | 0,156      | 13,85                               | 10,88      | 16,90      |
| MBC                 | 19                    | 0,077                         | 0,018              | 0,042      | 0,112      | 8,00                                | 4,33       | 11,80      |
| QoI + DMI           | 23                    | 0,133                         | 0,013              | 0,106      | 0,159      | 14,17                               | 11,23      | 17,19      |

<sup>a</sup>Grupos: Tabela 1.

<sup>b</sup>Número total de ensaios usados na análise.

<sup>c</sup>Log da razão de resposta média ( $\bar{L}_{prod}$ ) para o efeito de cada fungicida (dentro de cada grupo) na produtividade da giberela relativo ao tratamento controle, erro padrão do  $\bar{L}_{prod}$  (E.P. ( $\bar{L}$ )), limites inferior ( $IC_{Inferior}$ ) e superior ( $IC_{Superior}$ ) do intervalo de confiança a 95% do  $\bar{L}_{sev}$ . Houve efeito significativo para todos os tratamentos ( $P < 0,001$ ).

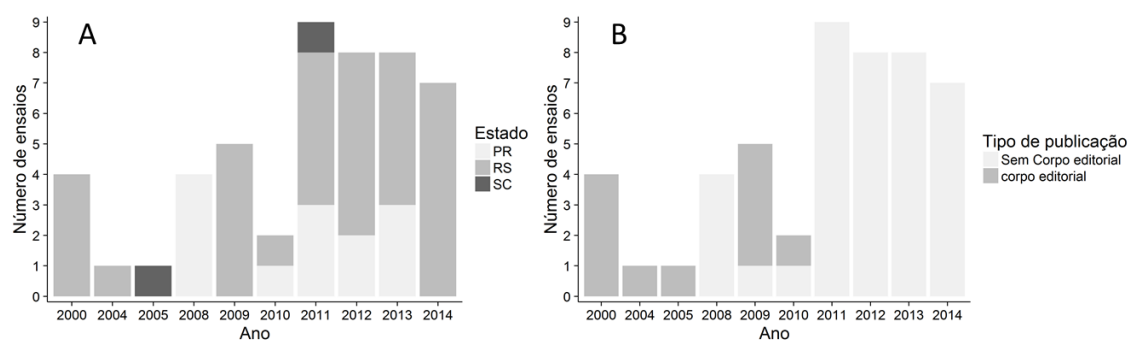
<sup>d</sup>Retorno em produtividade ( $\bar{P}$ ) e limite inferior ( $IC_{Inf}$ ) e superior ( $IC_{Sup}$ ) do intervalo de confiança a 95% do  $\bar{P}$  estimados pela transformação reversa do  $\bar{L}_{prod}$  e dos limites do intervalo de confiança como,  $\bar{P} = (\exp(\bar{L}_{prod}) - 1) \times 100$ .

**Tabela S1.** Características dos ensaios de campo para o controle da giberela do trigo selecionados de uma revisão sistemática de estudos publicados no Brasil entre os anos 2000 e 2014, para a metanálise da eficácia do controle químico avaliada com base no controle da doença (severidade) e retorno em produtividade.

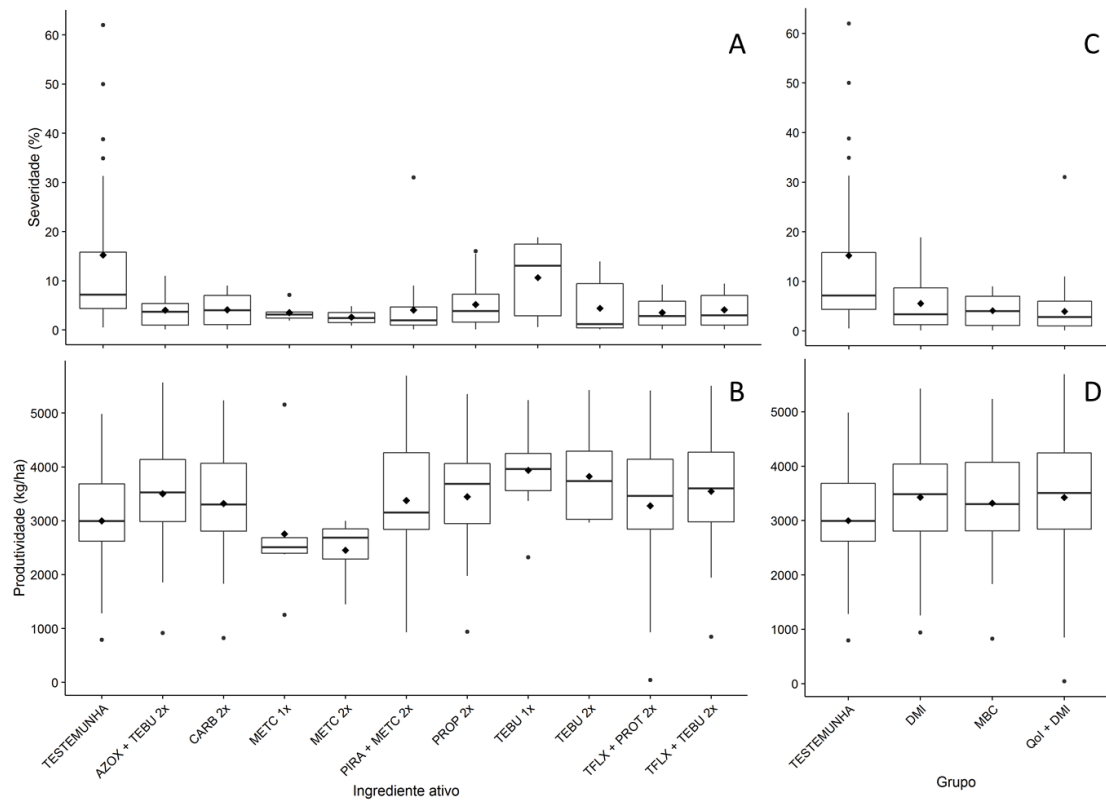
| Estudo | Ensaio | Ano  | Município      | Estado | Cultivar               | Data de plantio | Número de tratamentos | Severidade | Produtividade | Tipo de publicação | Autor                |
|--------|--------|------|----------------|--------|------------------------|-----------------|-----------------------|------------|---------------|--------------------|----------------------|
| 1      | 1      | 2000 | Passo Fundo    | RS     | BRS23                  | 26/6/2000       | 9                     | 38,8       | 2838          | Artigo             | Panisson et al. 2002 |
| 1      | 2      | 2000 | Passo Fundo    | RS     | BRS23                  | 8/7/2000        | 9                     | 34,9       | 3085          | Artigo             | Panisson et al. 2002 |
| 2      | 3      | 2000 | Passo Fundo    | RS     | BRS23                  | 26/6/2000       | 9                     | 38,8       | 2838          | Artigo             | Panisson et al. 2003 |
| 2      | 4      | 2000 | Passo Fundo    | RS     | BRS23                  | 8/7/2000        | 9                     | 34,9       | 3085          | Artigo             | Panisson et al. 2003 |
| 3      | 5      | 2004 | Muitos Capões  | RS     | BRSLouro               | 13/7/2004       | 13                    | 5,93       | 4984          | Artigo             | Casa et al. 2007     |
| 3      | 6      | 2005 | Lages          | SC     | BRSLouro               | 12/7/2005       | 6                     | 12,71      | 1835          | Artigo             | Casa et al. 2007     |
| 4      | 7      | 2008 | Ponta Grossa   | PR     | CD104                  | -               | 5                     | -          | 1718          | Resumo             | Basso et al.2009     |
| 4      | 8      | 2008 | Ponta Grossa   | PR     | BRS208                 | -               | 5                     | -          | 4770          | Resumo             | Basso et al.2009     |
| 4      | 9      | 2008 | Ponta Grossa   | PR     | BRSPardela             | -               | 5                     | -          | 4781          | Resumo             | Basso et al.2009     |
| 4      | 10     | 2008 | Ponta Grossa   | PR     | IPR130                 | -               | 5                     | -          | 3741          | Resumo             | Basso et al.2009     |
| 5      | 11     | 2009 | Cruz Alta      | RS     | Fundacep46<br>Nova Era | -               | 7                     | -          | 590           | Resumo             | Da Silva et al. 2010 |
| 6      | 12     | 2009 | Cruz Alta      | RS     | Campo Real             | -               | 7                     | 7,3        | 2764          | Artigo             | Spolti et al. 2013   |
| 6      | 13     | 2009 | Passo Fundo    | RS     | BRSGuamirim            | -               | 7                     | 5          | 1283          | Artigo             | Spolti et al. 2013   |
| 6      | 14     | 2009 | Lagoa Vermelha | RS     | Raízes                 | -               | 7                     | 10,1       | 1602          | Artigo             | Spolti et al. 2013   |
| 6      | 15     | 2009 | Muitos Capões  | RS     | Supera                 | -               | 7                     | 31,3       | 2772          | Artigo             | Spolti et al. 2013   |
| 7      | 16     | 2010 | Toledo         | PR     | CD114                  | 20/5/2010       | 5                     | 4,14       | 2847,3        | Artigo             | Correa et al. 2012   |
| 8      | 17     | 2010 | Cruz Alta      | RS     | Fundacep52             | 25/6/2010       | 4                     | -          | 2375          | Resumo             | Quaini et al. 2012   |
| 9      | 18     | 2011 | Itaara         | RS     | Fundacep52             | 1/7/2011        | 13                    | 39         | 1191,6        | Resumo             | Maffini et al. 2012  |
| 10     | 19     | 2011 | Castro         | PR     | BRS208                 | 21/7/2011       | 10                    | 13,7       | 3610          | Boletim            | Santana et al. 2012  |
| 10     | 20     | 2011 | Cruz Alta      | RS     | BRS208                 | 15/6/2011       | 10                    | 7,7        | 2718          | Boletim            | Santana et al. 2012  |
| 10     | 21     | 2011 | Passo Fundo    | RS     | BRS208                 | 30/6/2011       | 10                    | 1,3        | 2569          | Boletim            | Santana et al. 2012  |

|    |    |      |                     |    |                |           |    |      |         |           |                     |
|----|----|------|---------------------|----|----------------|-----------|----|------|---------|-----------|---------------------|
| 10 | 22 | 2011 | Condor              | RS | BRS208         | 8/6/2011  | 10 | 3,8  | 3050    | Boletim   | Santana et al. 2012 |
| 10 | 23 | 2011 | Lages               | SC | BRS208         | 10/8/2011 | 10 | 0,5  | 4190    | Boletim   | Santana et al. 2012 |
| 10 | 24 | 2011 | Guarapuava          | PR | BRS208         | 9/7/2011  | 10 | 10   | 4198    | Boletim   | Santana et al. 2012 |
| 10 | 25 | 2011 | Ponta Grossa        | PR | BRS208         | 17/6/2011 | 10 | 1,1  | 2993    | Boletim   | Santana et al. 2012 |
| 11 | 26 | 2011 | Passo Fundo         | RS | Mirante        | 12/7/2011 | 7  | 0,4  | 2327,2  | Tese      | Viana, 2013         |
| 11 | 27 | 2012 | Passo Fundo         | RS | Mirante        | 25/6/2012 | 7  | 2,1  | 1404,4  | Tese      | Viana, 2013         |
| 11 | 28 | 2012 | Passo Fundo         | RS | Mirante        | 13/7/2012 | 7  | 8,9  | 878     | Tese      | Viana, 2013         |
| 12 | 29 | 2012 | Ponta Grossa        | PR | BRS208         | 29/6/2012 | 9  | 3    | 2024    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 12 | 30 | 2012 | Ponta Grossa        | PR | BRS208         | 2/8/2012  | 9  | 6,3  | 4033    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 12 | 31 | 2012 | Cruz Alta           | RS | BRS208         | 26/6/2012 | 9  | 8,7  | 3015    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 12 | 32 | 2012 | Capão Bonito do Sul | RS | BRS208         | 20/6/2012 | 9  | 6,6  | 793     | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 12 | 33 | 2012 | Passo Fundo         | RS | BRS208         | 13/6/2012 | 9  | 1,8  | 2673    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 12 | 34 | 2012 | Guarapuava          | RS | BRS208         | 30/6/2012 | 9  | 16,5 | 3331    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 13 | 35 | 2013 | Passo Fundo         | RS | BRS208         | -         | 10 | 6    | 3591    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 13 | 36 | 2013 | Passo Fundo         | RS | BRS208         | -         | 10 | 7    | 3478    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 13 | 37 | 2013 | Giruá               | RS | Campeiro       | -         | 10 | 8    | 2108    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 13 | 38 | 2013 | Capão Bonito do Sul | RS | Campeiro       | -         | 10 | 6    | 2115    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 13 | 39 | 2013 | Cruz Alta           | RS | Fundacep Bravo | -         | 10 | 2    | 3996    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 13 | 40 | 2013 | Guarapuava          | PR | BRSGuabijú     | -         | 10 | 62   | 3756    | Boletim   | Santana et al. 2014 |
| 14 | 41 | 2013 | Guarapuava          | PR | BRSGuamirim    | -         | 7  | 50   | 4392,5  | Relatório | Feksa et al. 2013   |
| 15 | 42 | 2013 | Guarapuava          | PR | CD105          | -         | 11 | 62   | 3755,75 | Relatório | Feksa et al. 2013   |
| 16 | 43 | 2014 | Coxilha             | RS | Taurum         | 15/7/2014 | 7  | -    | 1836    | Resumo    | Tonin et al. 2015   |
| 16 | 44 | 2014 | Coxilha             | RS | TBIO Alvorada  | 15/7/2014 | 7  | -    | 3122    | Resumo    | Tonin et al. 2015   |
| 16 | 45 | 2014 | Coxilha             | RS | Mirante        | 15/7/2014 | 7  | -    | 3557    | Resumo    | Tonin et al. 2015   |
| 16 | 46 | 2014 | Coxilha             | RS | TBIO Toruk     | 15/7/2014 | 7  | -    | 3716    | Resumo    | Tonin et al. 2015   |
| 17 | 47 | 2014 | Cerro Largo         | RS | Quartzo        | 10/6/2014 | 6  | 62,2 | 598,4   | Resumo    | Bonfada et al. 2015 |
| 18 | 48 | 2014 | Júlio de Castilhos  | RS | linhagem 01/14 | 10/6/2014 | 7  | 3,36 | -       | Resumo    | Balem et al. 2015   |
| 18 | 49 | 2014 | Júlio de Castilhos  | RS | TEC 10         | 10/6/2014 | 7  | 6,79 | -       | Resumo    | Balem et al. 2015   |

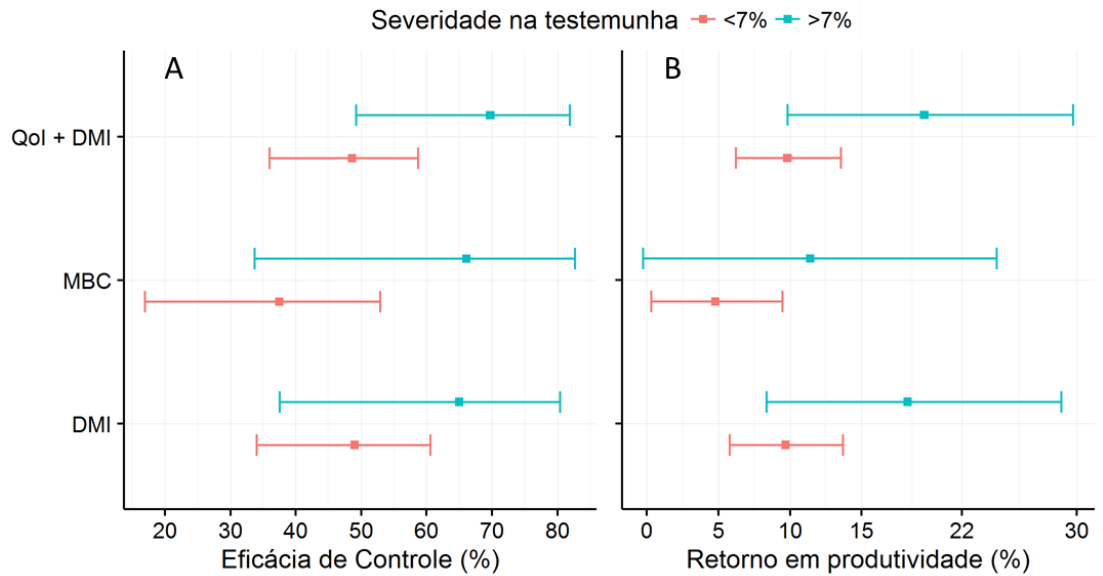
## Figuras



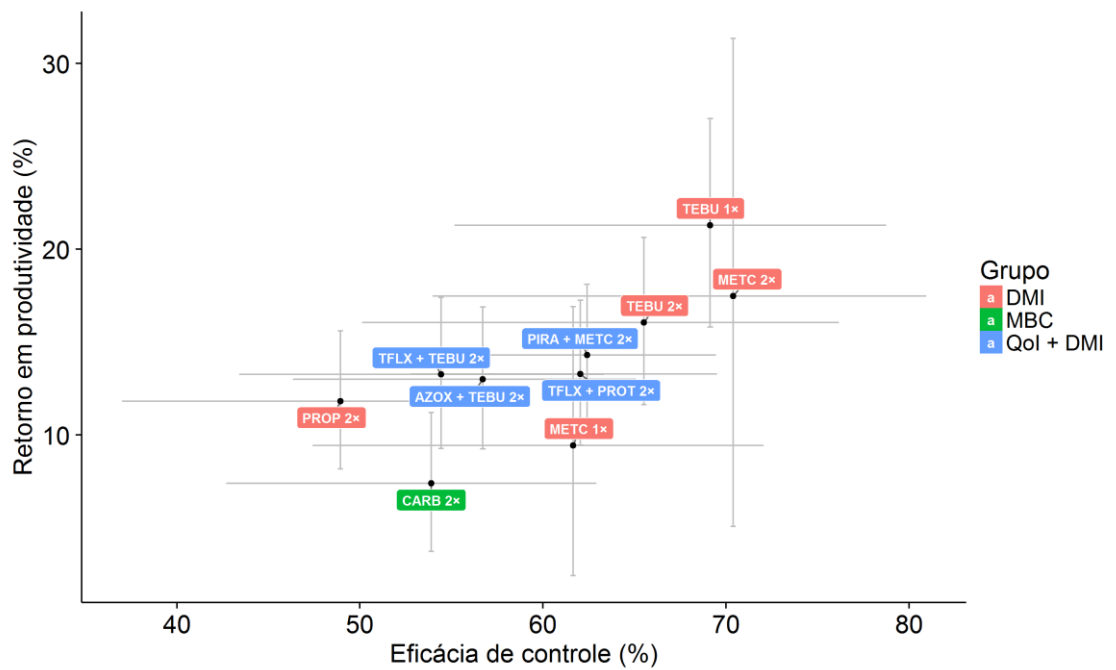
**Figura 1.** Distribuição dos ensaios encontrados na revisão sistemática. **A**, Número total de ensaios, conduzidos nos estados do sul do Brasil ao longo dos anos. **B**, Número de ensaios publicados em revistas com ou sem corpo editorial em função do ano em que foi conduzido ( $n = 49$  ensaios).



**Figura 2.** Box plot resumindo **A**, a distribuição dos valores médios de severidade e **B**, de produtividade do trigo das parcelas tratadas e não tratadas com fungicidas, individualmente, e **C** e **D**, para os grupos, respectivamente. O losango e a linha dentro da caixa representam a média e mediana, respectivamente, enquanto as linhas acima e abaixo da caixa representa os percentis 75 e 25% dos dados, respectivamente. As barras verticais que se estendem para além das caixas representam os percentis 10 e 90% e os círculos indicam os *outliers*.



**Figura 3.** Efeito dos grupos de fungicidas na **A**, eficácia de controle da giberela **B**, e retorno em produtividade do trigo avaliados no controle de giberela sob baixa (<7% de severidade na testemunha) e alta (>7% de severidade na testemunha) intensidade de doença no Brasil. Os pontos são as médias das medidas de efeito e os traços são os intervalos de confiança 95% transformados para eficácia de controle e retorno em produtividade.



**Figura 4.** Relação entre a eficácia de controle da giberela e o retorno em produtividade. Os pontos são os valores médios das medidas de efeito para cada fungicida, e as linhas horizontais representam o intervalo de confiança 95% para a eficácia de controle e as linhas verticais representam o intervalo de confiança 95% para o retorno em produtividade.

## CONCLUSÕES GERAIS

### ARTIGO 1

- 1) Há grande variação na sensibilidade ao tebuconazol e ao carbendazim, com isolados resistentes, tanto a carbendazim quanto a tebuconazol, e a ambos, em baixa frequência.
- 2) Existem evidências que sugerem uma possível resistência múltipla a tebuconazol e carbendazim.
- 3) A variação na sensibilidade é explicada pelos genótipos tricotecenos, que indicam diferentes espécies do complexo, sendo isolados 15-ADON menos sensíveis que isolados NIV.
- 4) Uma mutação no gene *cyp51A* foi encontrada em um isolado resistente ao tebuconazol.

### ARTIGO 2

- 1) Estudos sobre eficácia de fungicida no manejo da giberela no Brasil são escassos e com resultados variáveis.
- 2) Os triazóis individualmente, no geral, são mais eficazes no controle de giberela.
- 3) A eficácia média é mais alta no Brasil (duas aplicações) do que nos Estados Unidos (uma aplicação).
- 4) Os fungicidas apresentam mais alta eficácia sob maior pressão de doença.