



ELAINE APARECIDA GUIMARÃES

**ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS AO
SORGO NO BRASIL: DIVERSIDADE,
PATOGENICIDADE E POTENCIAL TOXIGÊNICO**

**LAVRAS - MG
2016**

ELAINE APARECIDA GUIMARÃES

**ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS AO SORGO NO BRASIL:
DIVERSIDADE, PATOGENICIDADE E POTENCIAL TOXIGÊNICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor.

Orientador
Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

Coorientadora
Dra. Dagma Dionísia da Silva

**LAVRAS - MG
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Guimarães, Elaine Aparecida.

Especies de *Fusarium* associadas ao sorgo no Brasil:
diversidade, patogenicidade e potencial toxigênico / Elaine
Aparecida Guimarães. – Lavras : UFLA, 2016.

97 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. Sorghum. 2. *Fusarium fujikuroi* species complex. 3.
Micotoxinas. 4. Podridão do colmo. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

ELAINE APARECIDA GUIMARÃES

**ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS AO SORGO NO BRASIL:
DIVERSIDADE, PATOGENICIDADE E POTENCIAL TOXIGÊNICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 8 de julho de 2016.

Dr. Flávio H. V. Medeiros	UFLA
Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dra. Patrícia Gomes Cardoso	UFLA
Dra. Dagma Dionísia da Silva	EMBRAPA Milho e Sorgo

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning
Orientador

**LAVRAS – MG
2016**

*Aos meus pais José Bento e Maria Terezinha, irmã Francisca
e demais familiares e amigos, pelo apoio e carinho.
A meu marido Gilberto, pelo incentivo e afeto.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Ludwig H. Pfenning e a Dra. Dagma Dionísia da Silva pela atenção, confiança e orientação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Luciano V. Cota e aos pesquisadores, Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães, Dr. Fabrício Eustáquio Lanza e Dr. Frederick Mendes Aguiar pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Sofia Chulze, a Doutoranda Maria Veronica Fumero da Universidade Nacional de Rio Cuarto, Argentina e a Dra. Valéria A. V. Queiroz da Embrapa Milho e Sorgo, pelas valiosas contribuições na realização das análises de micotoxinas.

Ao colega Dr. Maruzanete P. de Melo pela valiosa contribuição inicial neste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela participação e valiosas sugestões.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos e da Embrapa Milho e Sorgo, especialmente a Edinho, Clóvis, Gláucio, Rafael, Osni, Reinaldo e Dênio pela colaboração na condução do trabalho.

Às amigas da república Amanda, Sarita, Marielle e Fátima que alegraram meu dia a dia.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO GERAL

Espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) podem ser encontradas em sorgo, milheto e milho como endófitos, patógenos ou produzindo micotoxinas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de espécies do FFSC, que ocorrem em associação com o sorgo no Brasil e avaliar seu potencial toxigênico e patogênico. No capítulo 1 foi feita uma revisão de literatura sobre o sorgo, o FFSC, as doenças causadas por espécies do FFSC e as micotoxinas produzidas por elas. No capítulo 2, isolados provenientes de grãos de sorgo de diferentes regiões do Brasil foram avaliados por meio de análises filogenéticas da região *fator de alongação-1 α* (*Tef-1 α*), teste de compatibilidade sexual, marcadores morfológicos, produção *in vitro* de micotoxinas (fumonisinas B₁, B₂ e moniliformina) e testes de patogenicidade em colmos de sorgo, milheto e milho. A análise filogenética do gene *Tef-1 α* , mostrou a presença das espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides*. Os marcadores morfológicos avaliados confirmam a identidade dos isolados. Entre os isolados de *F. proliferatum* e *F. thapsinum* foi observada a produção de altos níveis de FB₁ e moniliformina, enquanto a produção de FB₂ ocorreu apenas eventualmente. Isolados de *F. verticillioides* produziram altos níveis de FB₁ e FB₂ e diferenciaram de *F. proliferatum* e *F. thapsinum* pela produção de baixos níveis de moniliformina. Entre os isolados de *F. andiyazi* avaliados, uma alta variação na quantidade de micotoxinas foi observada. Metade dos isolados produziu fumonisinas e moniliformina em baixos e altos níveis, enquanto a outra metade não produziu toxinas. A filogenia indica que mais de uma população ou mesmo espécie pode estar presente no Brasil. Isolados selecionados das quatro espécies induziram sintomas de podridão de colmo em cultivares de sorgo, milho e milheto. *F. thapsinum* e *F. andiyazi* se mostraram mais agressivos ao sorgo, enquanto *F. verticillioides* e *F. proliferatum* foram mais agressivos ao milho. No capítulo 3, um estudo em campo foi conduzido para expandir o conhecimento sobre a habilidade das quatro espécies de *Fusarium* de colonizar grãos de sorgo e produzir fumonisinas, além de conhecer os danos provocados por essas espécies quanto à produtividade de grãos e a germinação de sementes. Panículas de três cultivares de sorgo foram inoculadas com isolados das quatro espécies no período da safrinha (2015) e da safra (2015/2016). Foram realizadas análises da incidência de *Fusarium* nos grãos, teste de germinação de sementes, avaliação da produtividade e detecção de fumonisinas. As três cultivares de sorgo analisadas foram susceptíveis à colonização pelas espécies de *Fusarium* avaliadas, sendo que o cultivar BRS 308 apresentou maiores médias de incidência. Os isolados foram capazes de produzir fumonisinas em diferentes concentrações, sendo a espécie *F. proliferatum* a que produziu maiores teores de fumonisinas em todos as cultivares analisados. A produtividade das plantas e a

taxa de germinação das sementes também foram afetadas. No capítulo 4 são apresentados resultados sobre *F. andiyazi*, que não foram incluídos nos capítulos 2 e 3 e que serão utilizados na elaboração de outra publicação. Concluiu-se que as espécies de *Fusarium* podem afetar a produção de sorgo no Brasil. Portanto, a incidência de espécies deve ser cuidadosamente monitorada para garantia da qualidade e segurança de sorgo produzido no país.

Palavras-chave: *Sorghum*. *Fusarium fujikuroi* species complex. Micotoxinas. Podridão do colmo.

GENERAL ABSTRACT

Species of the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) can be found in association with sorghum, millet and corn as endophytes, pathogens or mycotoxin producers. The aim of this study was to evaluate the diversity of species in the FFSC which occur in association with sorghum in Brazil and to evaluate the toxigenic and pathogenic potential. In chapter 1, a literature review was conducted regarding sorghum, the diseases caused by species of the FFSC and mycotoxin production. In chapter 2, isolates from sorghum grains from different regions of Brazil were evaluated by phylogenetic analysis of the gene region elongation factor 1- α region (*Tef-1 α*), sexual compatibility tests, morphological markers, *in vitro* production of mycotoxins fumonisin B₁, B₂ and moniliformin, and pathogenicity tests in sorghum, millet and corn stalks. The phylogenetic analysis of the *Tef-1 α* gene showed the presence of *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* and *F. verticillioides*. The morphological markers confirmed the identity of the isolates. Among the isolates of *F. proliferatum* and *F. thapsinum*, the production of high levels of FB₁ and moniliformin was observed, while the production of FB₂ occurred only occasionally. *F. verticillioides* isolates produced higher levels of FB₁ and FB₂ and differentiated themselves from *F. proliferatum* and *F. thapsinum* through the production of low levels of moniliformin. A high variation in the amount of mycotoxins was observed among *F. andiyazi* isolates. Half of the isolates produced fumonisin and moniliformin at low and high levels, while the other half did not produce toxins. The phylogeny indicates diversity within *F. andiyazi*, suggesting that more than one population or species may be present in Brazil. Isolates selected from the four species induced stem rot symptoms in sorghum, maize and millet cultivars. *F. thapsinum* and *F. andiyazi* were more aggressive to sorghum, while *F. verticillioides* and *F. proliferatum* were more aggressive to corn. In chapter 3, a field study was conducted to evaluate the ability of the four species of *Fusarium* to colonize sorghum grains and produce fumonisin. The damage caused by these species to grain yield and seed germination was also assessed. Panicles of three sorghum cultivars were inoculated with isolates of the four species in the off-season period (2015) and in the harvest period (2015/2016). Analyses of the incidence of *Fusarium* in the grains, a seed germination test, an evaluation of productivity and the detection of fumonisin were performed. The three analyzed sorghum cultivars were susceptible to colonization by *Fusarium*

species, and the BRS 308 showed a higher average of incidence. The isolates were able to produce fumonisins in different concentrations, and *F. proliferatum* produced higher levels of fumonisins in all cultivars analyzed. The productivity of the plants and the germination of seeds were also affected. Chapter 4 presents more results obtained on *F. andiyazi* that were not included in chapters 2 and 3 and will be used in the preparation of another publication. It was concluded that the species of *Fusarium* can affect sorghum production in Brazil. Therefore, the incidence of these species should be carefully monitored for quality assurance and for the safety of the sorghum produced in the country.

Keywords: *Sorghum*. *Fusarium fujikuroi* species complex. Mycotoxins. Stem rot.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	21
----------------	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Isolados de <i>Fusarium</i> provenientes de sorgo de diferentes regiões geográficas do Brasil e isolados testadores e de referência usados no trabalho. (Continua).....	37
Tabela 2	Sequências de espécies do FFSC correspondentes a região gênica <i>tef1-α</i> depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas.....	43
Tabela 3	Micotoxinas produzidas pelas espécies <i>F. proliferatum</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. verticillioides</i> e <i>F. andiyazi</i> isoladas de sorgo no Brasil.....	55
Tabela 4	Média de severidade dos isolados de <i>F. andiyazi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. thapsinum</i> e <i>F. verticillioides</i> , inoculados em colmos de milho, sorgo e milheto. (Continua).....	58

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Média da incidência de <i>Fusarium</i> nas cultivares AG 50A70, BRS 310 e BRS 308.	79
Tabela 2	Média de fumonisinas totais nos experimentos plantados na safrinha (1) e safra (2).	80
Tabela 3	Teores de fumonisinas totais dos três cultivares de sorgo inoculados com <i>F. andiyazi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. verticillioides</i> e da testemunha não inoculada.	81
Tabela 4	Média de produção (kg/ha) nos experimentos plantados na safrinha (1) e safra (2).	84
Tabela 5	Média de produtividade e de percentagem de sementes mortas dos três cultivares de sorgo inoculados com <i>F. andiyazi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. verticillioides</i> e da testemunha não inoculada.....	85
Tabela 6	Média da porcentagem de sementes mortas nos cultivares AG 50A70, BR S310 e BR S308.	85

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Relação dos cruzamentos entre isolados de <i>F. andiyazi</i> avaliados após incubação a 22-23°C e luz constante.	93
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1	Árvore filogenética gerada pela análise de <i>Máxima parcimônia</i> a partir de sequências do gene <i>tef-1a</i> dos isolados de <i>Fusarium</i> obtidos nesse trabalho e isolados de referência pertencentes ao <i>Gibberella fujikuroi species complex</i>	50
Figura 2	Marcadores morfológicos das espécies de <i>Fusarium</i> . A. Coloração amarela de <i>F. thapsinum</i> ; B. Cadeias longas de microconídios de <i>F. verticillioides</i>	53

CAPÍTULO 3

Figura 1	Condições climáticas durante o período de condução dos experimentos na safrinha (janeiro a maio de 2015) e na safra (dezembro de 2015 a abril de 2016).	83
----------	--	----

CAPÍTULO 4

Figura 1	Características morfológicas do teleomorfo de <i>F. andiyazi</i>	95
----------	---	----

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	17
2	ESTADO DA ARTE	18
2.1	A cultura do sorgo	18
2.2	<i>Fusarium fujikuroi</i> Species Complex (FFSC).....	19
2.3	Doenças causadas por espécies do FFSC.....	22
1.4	Micotoxinas produzidas por espécies do FFSC.....	23
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 2 Filogenia, potencial toxigênico e patogenicidade de espécies do <i>Fusarium fujikuroi</i> species <i>complex</i> associadas ao sorgo no Brasil	32
	RESUMO	33
1	INTRODUÇÃO	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Obtenção dos isolados.....	36
2.2	Sequenciamento e análises filogenéticas.....	41
2.3	Determinação de <i>mating types</i> e teste de compatibilidade sexual.....	44
2.4	Caracterização morfológica.....	45
2.5	Perfil de micotoxinas dos isolados	46
2.6	Teste de patogenicidade em colmos de sorgo, milheto e milho	48
3	RESULTADOS	49
3.1	Análise filogenética	49
3.2	Determinação de <i>mating types</i> e compatibilidade sexual	51
	mostraram-se viáveis, germinando após 12 horas de incubação.	51
3.3	Caracterização morfológica.....	51
3.4	Perfil de micotoxinas dos isolados	54
3.5	Teste de patogenicidade em colmos de sorgo, milheto e milho	56
4	DISCUSSÃO	60

	CAPÍTULO 3	Produção de fumonisinas em sorgo pelas espécies <i>Fusarium andiyazi</i>, <i>F. thapsinum</i>, <i>F. proliferatum</i> e <i>F. verticillioides</i>	69
		RESUMO	70
1	INTRODUÇÃO		72
2	MATERIAL E MÉTODOS		73
2.1	Isolados de <i>Fusarium</i> e cultivares testados		73
2.2	Preparo do inóculo e inoculação		74
2.3	Avaliação da produtividade e análise de sanidade dos grãos		75
2.4	Germinação de sementes		76
2.5	Análise de produção de fumonisinas		77
2.6	Análises dos dados		77
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO		78
3.1	Análise de sanidade dos grãos		78
3.2	Produção de fumonisinas		80
3.3	Produtividade e Germinação de sementes		84
3.4	Análise de correlação		86
4	CONCLUSÃO		86
	REFERÊNCIAS		87
	CAPÍTULO 4	Definição de <i>Fusarium andiyazi</i> como <i>mating population</i>	91
1	INTRODUÇÃO		92
	ANEXO A		96
	ANEXO B		97

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é um cereal cultivado em várias partes do mundo sendo particularmente importante em ambientes quentes e secos, onde é usado para substituir culturas mais sensíveis às variações ambientais. Em países em desenvolvimento, o sorgo destina-se à alimentação humana, enquanto em outros países é usado para a alimentação animal, destinado à ração, silagem ou pastejo. No Brasil o sorgo é usado exclusivamente para a alimentação animal e seu cultivo ocorre principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (CONAB, 2016; EMBRAPA, 2011).

O sorgo apresenta-se vulnerável ao ataque de diversos patógenos, dentre os quais se destacam fungos do gênero *Fusarium*, que representa um dos grupos mais importantes de fungos ascomicetos distribuídos em todo o mundo e responsáveis por grandes perdas econômicas devido à redução no rendimento de colheita e/ou a qualidade dos alimentos básicos (Leslie e Summerell, 2006).

Diversas espécies de *Fusarium* recuperadas de gramíneas incluindo milho, sorgo e milheto, foram anteriormente descritas como “*Fusarium moniliforme*”. Utilizando análises de sequências de DNA e compatibilidade sexual sabe-se que “*F. moniliforme*” representa hoje o *Fusarium fujikuroi species complex* (FFSC) que contém espécies filogenéticas e biológicas distintas (Leslie et al., 2005a).

As principais espécies de *Fusarium* associadas à cultura do sorgo, de acordo com a literatura internacional são *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. andiyazi* e *F. sacchari* (Leslie et al., 2005a; Sharma et al., 2011; Petrovic et al., 2013). Essas espécies causam podridão de colmo e de grãos em milho, sorgo e milheto, reduzindo a produção e qualidade dos grãos

(Frederiksen e Odvody, 2000). Essas espécies também são importantes por serem produtoras de micotoxinas, especialmente fumonisinas e moniliformina que acarretam danos à saúde humana e animal (Leslie et al., 2005a).

No Brasil, pouco se conhece sobre a ocorrência dessas espécies em grãos de sorgo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar espécies do FFSC associadas a grãos de sorgo no Brasil e avaliar o potencial das espécies em produzir fumonisinas e moniliformina e de causar podridão de colmo em sorgo, milho e milho, além de conhecer os danos provocados por essas espécies quanto a produtividade e a germinação de sementes.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 A cultura do sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) é uma planta que tem como centro de origem a África Central, na região da Etiópia e do Sudão, de onde se propagou por toda a África, Ásia e, posteriormente, América e Austrália sendo hoje o quinto cereal mais produzido no mundo, depois do milho, trigo, arroz e cevada. Esta gramínea é uma excelente fonte de energia, e tem grande utilidade em regiões quentes e secas, onde não se consegue boas produtividades de grãos ou de forragem cultivando outras espécies, como o milho (Borém et al., 2014). A maior área produzida localiza-se na África, enquanto a maior produção está na América do Norte (México e EUA). A produção mundial de sorgo, para a safra 2015/16, está estimada em 67,1 milhões de toneladas, representando um aumento de cerca de 5,5% (3,53 milhões de toneladas) em relação aos 63,6 milhões de toneladas produzidas na safra 2014/15. Já o consumo mundial, estimado em 62,79 milhões de toneladas, mostra um aumento de 7,72% (4,5

milhões de toneladas), em relação aos 58,29 milhões de toneladas da safra anterior (Conab, 2016; Embrapa, 2011).

Atualmente o Brasil está entre os 10 países maiores produtores de grãos de sorgo, a cultura está expandindo, principalmente no período de safrinha, em sucessão as culturas de verão (Embrapa, 2011; Borém et al., 2014). Em 2015, o estado de Goiás liderou a produção nacional de sorgo granífero com 851,1 mil toneladas, aumento de mais de 20% em relação à safra anterior, seguido por Minas Gerais (497,5 mil toneladas) e por Mato Grosso (206,7 mil toneladas) (Conab, 2016). O principal uso do sorgo no país é na alimentação animal, os grãos são usados em dietas caseiras e rações comerciais para monogástricos, ruminantes, peixes, crustáceos e pequenos animais domésticos. A planta inteira também é utilizada sob a forma de silagem ou forragem conservada, tanto para bovinos de leite como para gado de corte (Borém et al., 2014).

Embora no Brasil, o sorgo não seja amplamente utilizado na alimentação humana, seus grãos são altamente nutritivos e podem ser utilizados na produção de farinha para panificação, produção de amido industrial, pipoca, barra de cereais, dentre outros (Embrapa, 2011; Queiroz et al., 2009; Taylor et al., 2006). Por não possuir glúten o sorgo é uma boa alternativa para a produção de alimentos destinados a pessoas que apresentam a doença celíaca (Queiroz et al., 2009).

2.2 *Fusarium fujikuroi* Species Complex (FFSC)

O termo “*Fusarium fujikuroi* species complex” (FFSC), refere-se a um grupo monofilético dentro do gênero *Fusarium* e que corresponde principalmente à seção *Liseola*, mas que também acomoda certas espécies originalmente classificadas em outras seções de *Fusarium* (Nirenberg e O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 1998, 2000; Geiser et al., 2005). A Seção

Liseola foi estabelecida por Wollenweber e Reinking (1935) para acomodar espécies caracterizadas pela produção de macroconídios em esporodóquios ou pionotos, microconídios em falsas cabeças e/ou cadeias e que não produzem clamidósporos (Snyder e Hansen, 1945; Leslie e Summerell, 2006). Dez espécies foram aceitas na seção por Nirenberg (1976) e Gerlach e Nirenberg (1982). Nelson et al. (1983) reconheceram apenas 4 espécies diferenciadas estritamente por critérios morfológicos como presença de microconídio em cadeias, polifiálides e microconídios globosos com formato de pêra. Posteriormente os autores usaram o nome *F. moniliforme* Sheldon [teleomorfo: *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw.] para o fungo que é referido como *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (teleomorfo: *Gibberella moniliformis* Wineland) por Gerlach e Nirenberg (1982).

A aplicação de conceito de espécie biológica e filogenética, junto com dados sobre patogenicidade em plantas cultivadas, capacidade de produzir micotoxinas e distribuição geográfica, levaram a modificações na delimitação das espécies pertencentes ao FFSC (Kvas et al., 2009). As sequências dos genes *28S rDNA*, *mtSSU rDNA*, *calmodulina*, *histona-H3*, *fator de alongação-1 α* e *β -tubulina* são comprovadamente úteis para a reconstrução da filogenia do FFSC e também fornecem informações sobre a estrutura populacional em nível subespecífico, o que pode ser observado pela variação em sítios ao longo das sequências de cada gene. O'Donnell et al. (1998), realizaram um trabalho sobre a filogeografia do FFSC, e identificaram três grupos de espécies com provável origem nos continentes americano, africano e asiático.

O conceito de espécie biológica é importante para auxiliar nas limitações na identificação de espécies do FFSC. Treze espécies biológicas isoladas geneticamente, denominadas *mating populations* A-M foram identificadas no FFSC por meio de cruzamentos em laboratório (Tabela 1). As *mating populations* do FFSC são todas heterotáticas, com um mecanismo de um *locus*

MAT e dois idiomorfos, *MAT-1* ou *MAT-2*, ou seja, sequências não relacionadas presentes no mesmo locus do genoma (Leslie, 1995; Leslie e Summerell, 2006).

Tabela 1 *Mating populations* descritas dentro do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*

Espécies ^a	MP ^b	Referência ^c
<i>F. verticillioides</i>	A	Kuhlman 1982
<i>F. sacchari</i>	B	Leslie et al. 2005b
<i>F. fujikuroi</i>	C	Kuhlman 1982
<i>F. proliferatum</i>	D	Kuhlman 1982
<i>F. subglutinans</i>	E	Booth 1971
<i>F. thapsinum</i>	F	Klittich et al. 1997
<i>F. nygamai</i>	G	Klaasen e Nelson 1996
<i>F. circinatum</i>	H	Nirenberg e O'Donnell 1998
<i>F. konzum</i>	I	Zeller et al. 2003
<i>F. xylarioides</i>	J	Booth 1971
<i>F. temperatum</i>	K	Scaufaire et al. 2011
<i>F. tuiense</i>	L	Lima et al. 2012
<i>F. musae</i>	M	Van Hove et al. 2011

^aEspécies biológicas do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*

^bDesignação alfabética para espécies biológicas dentro do FFSC

^cReferências das descrições das espécies biológicas

As espécies *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. sacchari* tem sido relatadas associadas ao sorgo, produzindo micotoxinas nos grãos ou causando doenças conhecidas como podridão vermelha do colmo e grão mofado (Leslie et al., 2005a; Ploetz, 2006; Summerell et al., 2010; Sharma et al., 2011; Petrovic et al., 2013). Essas espécies apresentam características morfológicas comuns como macroconídios contendo 3-6 septos, retos e ligeiramente curvados produzidos em monofiálides ou conidióforos ramificados. Os microconídios são clavados a ovóides com base achatada, geralmente sem septos. *F. verticillioides* e *F. thapsinum* apresentam microconídios formados em cadeias longas. Em *F. andiyazi* os microconídios são produzidos em cadeias a

partir de monofiálides e são produzidos pseudoclamidósporos. *F. proliferatum* produz microconídios em cadeias curtas a partir de polifiálides e *F. sacchari* produz microconídios em falsas cabeças a partir de monofiálides ou polifiálides e não produz clamidósporo (Leslie e Summerell, 2006). Como essas espécies possuem características morfológicas muito similares, os conceitos de espécies filogenéticas e biológicas devem ser utilizados para uma identificação correta.

2.3 Doenças causadas por espécies do FFSC

Várias espécies do FFSC são potencialmente patogênicas ao sorgo. A infecção do colmo ou raiz pode reduzir a produção e a qualidade dos grãos, enquanto a infecção nas panículas resulta em grãos com qualidade reduzida e contaminação por micotoxinas (Leslie et al., 2005a; Funnell-Harris et al., 2010).

O mofamento dos grãos de sorgo é uma doença de panícula causada por fungos, incluindo espécies do gênero *Fusarium* como *F. thapsinum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. andiyazi*, que infectam e colonizam os grãos levando a perdas pela redução do tamanho e peso, além de diminuição no valor de mercado e nutritivo dos grãos. Os principais sintomas da doença são crescimento superficial de micélio fúngico e descoloração da semente, variando de rosa a avermelhado ou de preto a acinzentado. A suscetibilidade do hospedeiro e condições ambientais ideais para o crescimento dos fungos são fatores que favorecem o estabelecimento da doença (Prom, 2004; Embrapa, 2011).

Podridões de colmo estão entre as doenças que mais prevalecem na cultura do sorgo. As principais podridões de colmo em sorgo e seus agentes causais incluem: podridão seca (*Macrophomina phaseolina*), podridão vermelha do colmo (*F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides*) e antracnose do colmo (*Colletotrichum sublineolum*). Podridões de colmo menos importantes ou

com uma distribuição limitada incluem *Pokkah boeng* (*F. proliferatum*, *F. subglutinans* e *F. thapsinum*), podridão bacteriana de colmo (*Erwinia* spp.) e murcha de *Acremonium* (*Acremonium strictum*) (Leslie, 2002; Embrapa, 2011; Bandara et al., 2015).

A podridão vermelha do colmo causada por espécies do FFSC é uma doença comum nas regiões produtoras de sorgo. A doença afeta o enchimento dos grãos e provoca o enfraquecimento causando, geralmente, o tombamento e/ou o quebramento do colmo. Internamente, os tecidos do colmo e do pedúnculo infeccionados adquirem uma coloração avermelhada, que progride de forma uniforme e continua do ponto inicial da infecção em direção à parte superior da planta (Frederiksen e Odvody, 2000; Embrapa, 2011). O inóculo primário consiste de conídios e micélio que sobrevivem em restos culturais, além disso, o patógeno pode ser transmitido pelas sementes (Leslie, 2002). O fungo penetra nas raízes e no colmo através de aberturas naturais ou ferimentos provocados por insetos, máquinas e nematóides. Entre os estágios de florescimento e de maturação da planta, a severidade da doença pode aumentar sob condições de baixas temperaturas e alta umidade, seguidas de um período de alta temperatura e baixa umidade (Embrapa, 2011; Bandara et al., 2015).

2.4 Micotoxinas produzidas por espécies do FFSC

Micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas espécies de fungos. A contaminação de alimentos por micotoxinas tem sido relatada no mundo todo, principalmente em grãos e cereais (Benett e Klich, 2003). Alimentos, grãos e derivados são colonizados por fungos durante os estágios de produção, processamento, transporte e armazenamento. Os fatores mais importantes que influenciam o crescimento e a produção de micotoxinas

são umidade, temperatura, condições de armazenamento e pH (Lacey e Magan, 1991).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana direta ou indiretamente. Diretamente, através do consumo dos cereais, oleaginosas e derivados. Animais que se alimentam com rações ou outros alimentos contaminados podem excretar micotoxinas no leite, carne e ovos, e conseqüentemente, constituir-se em fonte de contaminação indireta para os humanos (Molin e Valentini, 1999).

O sorgo pode ser contaminado por fungos produtores de micotoxinas, que podem ser limitantes à produção e qualidade dos grãos. Entre as espécies do FFSC associadas a esse cereal e que produzem micotoxinas, estão: *F. thapsinum* (ácido fusárico, moniliformina, fumonisinas), *F. verticillioides* (fumonisinas, ácido fusárico, fusarinas, tricotecenos), *F. proliferatum* (moniliformina), *F. andiyazi* (fumonisinas), *F. nygamai* (beauvericina, ácido fusárico e fumonisinas) e *F. sacchari* (beauvericina, ácido fusárico, e moniliformina) (Desjardins, 2006; Leslie e Summerell, 2006). Sendo que as micotoxinas consideradas mais importantes são a moniliformina e as fumonisinas por causa da sua alta incidência e seus efeitos adversos (Leslie et al., 2005a).

Existem diferentes tipos de fumonisinas, estruturalmente relacionadas: A (A₁ - A₄), B (B₁ - B₄), C (C₁ - C₄) e P¹⁰. No entanto, a que se encontra em maior abundância e a mais tóxica é a FB₁, seguindo-se a FB₂ e a FB₃. Essas micotoxinas são estáveis ao calor e resistem à maioria das condições de processamento, persistindo no produto final, como a ração animal. As fumonisinas podem ser encontradas principalmente em milho e seus derivados, além de arroz, sorgo e feijão (Labuda et al., 2003).

A análise genética de *F. verticillioides* identificou um grupo (*cluster*) de 17 genes (*FUM1-FUM3*, *FUM6-FUM-8*, *FUM10*, *FUM11* e *FUM13-FUM21*) relacionados a produção de fumonisinas. O gene *FUM1* codifica uma

policetídeo sintase (Fum1) essencial para a produção de fumonisinas. *FUM21* está localizado adjacente a *FUM1* e codifica um fator transcripcional que regula positivamente a expressão do gene *FUM1* e é requerido para a produção de fumonisinas (Desjardins, 2006). Vários genes adicionais localizados fora do cluster são envolvidos na regulação da biossíntese de fumonisinas. Esses genes codificam fatores transcripcionais de amplo domínio e reguladores globais de transcrição (Picot et al., 2010). Além disso, fatores ambientais também podem afetar a produção e levar a variação nos níveis de fumonisinas. Esses fatores incluem fonte de carbono, limitação de nitrogênio, temperatura, atividade de água, potencial de solutos e luz (Fanelli et al., 2013).

Quando ingerida por animais as fumonisinas podem alterar funções celulares importantes, como controle da integridade da membrana, proliferação celular, diferenciação e apoptose. Além disso, essas micotoxinas são conhecidas por causarem leucoencefalomácia em equinos, edemas pulmonares em suínos e câncer de esôfago em humanos, sendo este último com maior frequência na África do Sul (Marasas, 1995; Harrison et al., 1990; Leslie et al., 2005a). A Agência de Pesquisa Internacional sobre o Câncer avaliou o risco de fumonisinas para os seres humanos e as classificaram como grupo 2B (provavelmente cancerígeno) (Rheeder et al., 2002).

A moniliformina é uma micotoxina hidrossolúvel produzida por pelo menos 30 espécies de *Fusarium*, isoladas de diferentes substratos e regiões geográficas (Fumero et al., 2016). É um metabólito altamente tóxico a plantas e a várias espécies animais (Von Bargen et al., 2012). Os sinais clínicos de sua toxicidade em animais são fraqueza muscular, dificuldade respiratória, cianose, efeitos patológicos nos tecidos do coração e coma seguido por morte (Desjardins, 2006; Fumero et al., 2016).

Até o momento, nenhuma policetídeo sintase ou outras enzimas e genes envolvidos na biossíntese da moniliformina foram isolados. Entretanto, alguns

estudos indicam que os genes que controlam a produção de moniliformina não são ligados aos que controlam a produção de fumonisinas (Desjardins, 2006).

Além dos problemas relacionados a saúde humana e animal, as micotoxinas podem acarretar prejuízos ao agronegócio, uma vez que as barreiras sanitárias impostas por alguns países podem diminuir ou até inibir a entrada de produtos contaminados por esses metabólitos (Leslie et al., 2008). A partir de janeiro de 2012 começou a vigorar no Brasil o LMT (limite máximo tolerado) de 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para fumonisinas ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$) em milho em grãos para posterior processamento, LMT de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em farinha e creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha e LMT de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para amido de milho e outros produtos à base de milho (Anvisa, 2011). Devido à inexistência de uma legislação específica para fumonisina e moniliformina em sorgo no Brasil, os animais podem correr risco ao se alimentarem com grãos e seus produtos contaminados com essas micotoxinas.

Práticas para minimizar a contaminação do sorgo com micotoxinas, não são muito estudadas. Entretanto de acordo com relatos da literatura, o tratamento das sementes com fungicidas, uso de cultivares resistentes, rotação de culturas e boas práticas culturais podem reduzir a colonização dos fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas (Leslie e Logrieco, 2014).

REFERÊNCIAS

- ANVISA (2011) 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. Section 1, page 66.
- Bandara, Y. M. A. Y, Perumal, R. and Little, C. R. 2015. Integrating resistance and tolerance for improved evaluation of sorghum lines against *Fusarium* stalk rot and charcoal rot. *Phytoparasitica* 43:485-499.
- Bennett, J. W. and Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiol. Rev.* 16:497-516.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Eastern Press Limited, Kew Surrey.
- Borém, A., Pimentel, L. and Parrella, R. 2014. Sorgo do plantio a colheita. Viçosa, MG: Ed. UFV.
- CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento (2015). Perspectivas para a Agropecuária. Volume 3 - Safra 2015/2016. Brasília, set. 2015, 130p.
- Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota U.S.A, 260 p.
- EMBRAPA (2011). Cultivo do Sorgo. Sistemas de Produção. 7. ed. 2011. Available in: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo7_ed/index.htm
- Fanelli, F., Iversen, A., Logrieco, A. F. and Mulè, G. 2013. Relationship between fumonisin production and *FUM* gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *Food Addit. Contam.* 30:365-371.
- Frederiksen, R. A. and Odvody, G. N. (eds.). 2000. Compendium of *Sorghum* Diseases. 2nd ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Fumero, M. V., Sulyok, M. and Chulze, S. 2016. Ecophysiology of *Fusarium temperatum* isolated from maize in Argentina. *Food Addit. Contam.* 33:147-156.

Funnell-Harris, D. L., Pedersen, J. F. and Sattler, E. S. 2010. Alteration in lignin biosynthesis restricts growth of *Fusarium* spp. brown midrib sorghum. *Phytopathology* 100:671-681.

Geiser, D. M., Lewis Ivey, M. L., Hakiza, G.; Juba, J. H. and Miller, S. A. 2005. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* complex. *Mycologia* 97:191-201.

Gerlach, W. and Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium*-a pictorial atlas. Mitt.Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem.

Harrison, L. R., Colvin, B. M., Greene, J. T., Newman, L. E. and Cole, J. R. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisinB1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2:217-221.

Klaasen, J. A and Nelson, P. E. 1996. Identification of a mating population, *Gibberella nygamai* sp. nov., within the *Fusarium nygamai* anamorph. *Mycologia* 88:965-969.

Klittich, C. J. R., Nelson, P. E and Marasas, W. F. O. 1997. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* 89:643-652.

Kuhlman, E. G. 1982. Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 74:759-768.

Kvas, M., Marasas, W. F. O., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. and Steenkamp, E. T. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Div.* 34:1-21.

Labuda, R., Tancinova, D. E. and Hudec, K. 2003. Identification and enumeration of *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Ann. of Agricult. Environ. Med.* 10:61-66.

Lacey, J. and Magan, N. 1991. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations. In: Chelkowski, J. *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.* Amsterdam: Elsevier Science:77-118.

Leslie, J. F. 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Can. J. Bot.* 73:S282-S291.

- Leslie, J. L. 2002. Sorghum and Millets Diseases. Iowa State Press, USA, 504 p.
- Leslie, J., Bandyopadhyay, R. and Visconti, A. 2008. Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade. Hardback, 480 p.
- Leslie, F. F. and Logrieco, A. 2014. Micotoxins reduction in grains chains. Wiley-Blackwell, USA, 376 p.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Lamprecht, S. C., Rheeder, J. P. and Marasas, W. F. O. 2005a. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A., Bullock, S. and Doe, F. J. 2005b. Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*. *Mycologia* 97:718-724.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Malden: Blackwell, USA, 420 p.
- Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S. S., Abreu, L. M. and Leslie, J. F. 2012. *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 104:1408–1419.
- Marasas, W. F. O. 1995. Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural Toxins* 3:193–198.
- Molin, R. and Valentini, M. L. 1999. Simpósio sobre micotoxinas em grãos. Fundação Cargil. 208p.
- Nelson, P.E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Nirenberg, H. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst., Land-Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem* 169: 1-117.
- Nirenberg, H. I. and O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:434-458.

O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T. and Cigelnik, E. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.

Petrovic, T., Burguess, L. W., Cowie, I., Warren, R. A. and Harvey, P. R. 2013. Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in Northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize. *Eur. J. Pl. Pathol.* 136:773-788.

Picot, A., Barrean, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C. and Richard-Forget, F. 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit. Rev. Microbiol.* 36:221-231.

Ploetz, R. C. 2006. *Fusarium*-Induced disease of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96:648-652.

Prom, L. K. 2004. The effects of *Fusarium thapsinum*, *Curvularia lunata*, and their combination on sorghum germination and seed mycoflora. *J. New Seeds* 6:39-49.

Queiroz, V. A. V., Vizzotto, M., Carvalho, C. W. P. and Martino, H. S. D. 2009. O sorgo na alimentação humana. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 133).

Reeder, J. R., Marasas, W. F. O. and Vismer, H. F. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2101-2105.

Scauflaire, J., Gourgue, M. and Munaut, F. 2011. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 103:586-597.

Sharma, R., Thakur, R. P., Senthilvel, S., Nayak, S., Reddy, V., Rao, V. P. and Varshney, R. K. 2011. Identification and Characterization of Toxigenic Fusaria Associated with Sorghum Grain Mold Complex in India. *Mycopathologia* 171:223-230.

Snyder, W. C. and Hansen, H. N. 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *Am. J. Bot.* 32:657–666.

Summerell, B. A., Laurence, M. H., Liew, E. C. Y. and Leslie, J. F. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Div.* 44:3-13.

Taylor, J. R.N., Schober, T. J. and Bean, S. R. 2006. Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *J. Cereal Sci.* 44:252–271.

Van-Hove F., Waalwijk C., Logrieco, A.; Munaut, F. and Moretti, A. 2011. *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *Fusarium verticillioides*. *Mycologia* 103:570-580.

Von Bargaen, K. W., Lohrey, L., Cramer, B. and Humpf, H. U. 2012. Analysis of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin in cereals samples using ¹³C₂-moniliformin and high-resolution mass spectrometry. *Agric. Food Chem.* 60:3586-3591.

Wollenweber, H. W. and Reinking, O. A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin.

Zeller, K. A., Summerell, B. A., Bullock, S. and Leslie, J. F. 2003. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov., a new biological species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from prairie Grass. *Mycologia* 95:943-954.

CAPÍTULO 2 Filogenia, potencial toxigênico e patogenicidade de espécies do *Fusarium fujikuroi* species complex associadas ao sorgo no Brasil

Manuscrito preparado para submissão à revista Plant Disease

RESUMO

Espécies do *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) podem ser encontradas em sorgo e outras gramíneas como endófitos, patógenos causando podridão de colmo ou produzindo micotoxinas. O objetivo desse trabalho foi averiguar a ocorrência de espécies do FFSC em associação com grãos de sorgo no Brasil e avaliar seu potencial de produzir fumonisinas B₁, B₂ e moniliformina. A patogenicidade das espécies encontradas foi testada em colmos de sorgo, milho e milheto. Por meio de análise filogenética do gene *fator de alongação 1- α* , compatibilidade sexual e caracterização morfológica, os 70 isolados obtidos de sorgo foram identificados como *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides*. Entre os isolados de *F. proliferatum* e *F. thapsinum* a produção de altos níveis de FB₁ e moniliformina foi observada, enquanto a produção de FB₂ ocorreu apenas eventualmente. Isolados de *F. verticillioides* produziram altos níveis de FB₁ e FB₂ e diferenciaram de *F. proliferatum* e *F. thapsinum* pela produção de baixos níveis de moniliformina. Entre os isolados de *F. andiyazi* avaliados, uma alta variação na quantidade de toxinas foi observada. Metade dos isolados produziu fumonisinas e moniliformina em baixos e altos níveis, enquanto a outra metade não produziu toxinas. Isolados selecionados das quatro espécies induziram sintomas de podridão de colmo quando inoculados em sorgo, milho e milheto. As espécies *F. thapsinum* e *F. andiyazi* foram mais agressivas ao sorgo, enquanto *F. verticillioides* e *F. proliferatum* foram mais agressivas ao milho. A incidência de espécies de *Fusarium* e a provável produção de micotoxinas em sorgo devem ser cuidadosamente monitoradas para garantir a qualidade e segurança de sorgo produzido no país. Estratégias de manejo devem ser elaboradas para o controle da podridão de colmo.

Palavras-chave: *Sorghum*. *Fusarium fujikuroi* species complex. Micotoxinas. Podridão do colmo.

ABSTRACT

Species of the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) can be found in sorghum and other grasses as endophytes, pathogens causing stem rot or producing mycotoxins. The aim of this study was to investigate the occurrence of FFSC species in association with sorghum grains in Brazil and to assess their potential to produce fumonisin B₁, B₂ and moniliformin. The pathogenicity of the species was tested in sorghum, millet and corn stalks. Using phylogenetic analysis of the gene region elongation factor *1- α* , sexual compatibility and morphological characterization, 70 isolates obtained from sorghum were identified as *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* and *F. verticillioides*. Among the isolates of *F. proliferatum* and *F. thapsinum* the production of high levels of FB₁ and moniliformin was observed, while the production of FB₂ occurred only occasionally. *F. verticillioides* isolates produced higher levels of FB₁ and FB₂ and differentiated themselves from the *F. proliferatum* and *F. thapsinum* through the production of low levels of moniliformin. Among *F. andiyazi* isolates, a high variation in the amount of toxins was observed. Half of the isolates produced fumonisin and moniliformin at low and high levels, while the other half did not produce toxins. Isolates selected from the four species induced symptoms of stem rot when inoculated into sorghum, maize and millet. The species *F. thapsinum* and *F. andiyazi* were more aggressive to sorghum, while *F. verticillioides* and *F. proliferatum* were more aggressive to corn. The incidence of *Fusarium* species and the probable production of mycotoxins in sorghum must be carefully monitored to ensure the quality and safety of sorghum produced in the Brazil. Management strategies should be developed to control stem rot.

Keywords: *Sorghum*. *Fusarium fujikuroi* species complex. Mycotoxins. Stem rot.

1 INTRODUÇÃO

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é uma cultura particularmente importante em regiões mais quentes e secas, onde é usado para substituir plantas mais sensíveis às variações ambientais. Atualmente, o Brasil está entre os 10 países maiores produtores de grãos de sorgo no mundo sendo cultivado, principalmente no período de safrinha, em sucessão às culturas de verão (Embrapa, 2011; Borém et al., 2014; Conab, 2016). Em 2015, o estado de Goiás liderou a produção nacional de sorgo granífero com 851,1 mil toneladas, aumento de mais de 20% em relação à safra anterior, seguido por Minas Gerais (497,5 mil toneladas) e por Mato Grosso (206,7 mil toneladas), (Conab, 2016). A produção brasileira é destinada exclusivamente para alimentação animal, sendo os grãos ou a planta inteira usados na fabricação de ração, silagem ou pastejo (Embrapa, 2011; Borém et al., 2014).

Entre os fatores que afetam o rendimento da cultura, estão as doenças foliares, de grãos e de colmos (Embrapa, 2011). Espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) são potencialmente patogênicas a diversas gramíneas incluindo o sorgo, milheto e milho (Leslie et al., 2005). Espécies desse complexo podem infectar as plantas e causar podridão de colmo reduzindo a produção e qualidade dos grãos. A podridão de colmo é apontada como uma doença que prevalece na cultura do sorgo em todo mundo. As plantas infectadas frequentemente apresentam dano vascular, dos tecidos corticais no colmo e sistema radicular, que pode reduzir a captação de água e nutrientes. Sob condições severas, a doença resulta em desintegração completa de tecidos das raízes e dos colmos, que leva ao tombamento da planta (Bandara et al., 2015).

Além de causarem podridão de colmo, algumas espécies do FFSC colonizam os grãos sem produzir sintomas, mas produzem micotoxinas (Funnell-Harris et al., 2010). A contaminação de grãos de sorgo por fumonisinas

e moniliformina foi relatada em diversas regiões do mundo (Leslie et al., 2005; Sharma et al., 2011; Chala et al., 2014; Leslie e Logrieco, 2014). Este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade de espécies do FFSC associadas a sorgo nas principais regiões produtoras do Brasil usando filogenia molecular e teste de compatibilidade sexual e verificar o potencial dessas espécies de produzir fumonisinas e moniliformina e de causar podridão de colmo em cultivares de sorgo, milheto e milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados nesse trabalho 70 isolados de *Fusarium* provenientes de grãos de sorgo dos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia e São Paulo obtidos da Coleção Micológica de Lavras (CML). Também foram incluídos isolados testadores das espécies *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides*, um isolado de referência de *F. andiyazi*, 6 isolados de milheto provenientes dos estados de Minas Gerais e Bahia e dois isolados de *F. andiyazi* provenientes de milho do estado de Goiás. Todo material encontra-se preservado na CML (Tabela 1).

Tabela 1 Isolados de *Fusarium* provenientes de sorgo de diferentes regiões geográficas do Brasil e isolados testadores e de referência usados no trabalho. (Continua)

Espécie	Código CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Data do isolamento	MAT
<i>F. andiyazi</i>	2740	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Nov/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2744	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Nov/2011	1
<i>F. andiyazi</i>	2746	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Nov/2011	1
<i>F. andiyazi</i>	2754	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Set/2012	2
<i>F. andiyazi</i>	2755	<i>Pennisetum amaericanum</i>	Luiz Ed. Magalhães BA	Set/2012	Nd
<i>F. andiyazi</i>	2756	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Set/2012	1
<i>F. andiyazi</i>	2758	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Jul/2012	1
<i>F. andiyazi</i>	2762	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Abr/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2763	<i>Sorghum bicolor</i>	Uberlândia MG	Mar/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2768	<i>Sorghum bicolor</i>	Indianópolis MG	Set/2013	2
<i>F. andiyazi</i>	2780	<i>Sorghum bicolor</i>	Paracatu MG	Ago/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2783	<i>Sorghum bicolor</i>	Lavras MG	Jun/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2791	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Jul/2013	2
<i>F. andiyazi</i>	2793	<i>Sorghum bicolor</i>	Indianópolis MG	Ago/2013	2
<i>F. andiyazi</i>	2796	<i>Sorghum bicolor</i>	Chapadão do Sul MS	Ago/2012	1
<i>F. andiyazi</i>	2797	<i>Sorghum bicolor</i>	Birigui SP	Ago/2012	1
<i>F. andiyazi</i>	2800	<i>Sorghum bicolor</i>	Luiz Ed. Magalhães BA	Mar/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2801	<i>Sorghum bicolor</i>	Jardinópolis SP	Mai/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2802	<i>Sorghum bicolor</i>	Maurilândia GO	Ago/2013	2
<i>F. andiyazi</i>	2805	<i>Sorghum bicolor</i>	Rio Verde GO	Ago/2013	2
<i>F. andiyazi</i>	2807	<i>Sorghum bicolor</i>	Lavras MG	Ago/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2809	<i>Sorghum bicolor</i>	Indianópolis MG	Ago/2013	1
<i>F. andiyazi</i>	2812	<i>Zea mays</i>	Rio Verde GO	-	2

Tabela 1, Continua

Espécie	Código CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Data do isolamento	MAT
<i>F. andiyazi</i>	2813	<i>Zea mays</i>	Rio Verde GO	-	2
<i>F. andiyazi</i>	2815	<i>Sorghum bicolor</i>	Jardinópolis SP	Jan/2014	1
<i>F. andiyazi</i>	2817	<i>Sorghum bicolor</i>	Jardinópolis SP	Jan/2014	1
<i>F. andiyazi</i>	2821	<i>Sorghum bicolor</i>	Chapadão do Sul MS	Jan/2014	2
<i>F. andiyazi</i>	2822	<i>Sorghum bicolor</i>	Chapadão do Sul MS	Jan/2014	1
<i>F. andiyazi</i>	2823	<i>Sorghum bicolor</i>	Jardinópolis SP	Jan/2014	1
<i>F. andiyazi</i>	884	<i>Sorghum bicolor</i>	Etiópia	-	2
<i>F. proliferatum</i>	2769	<i>Sorghum bicolor</i>	Uberlândia MG	Nov/2012	2
<i>F. proliferatum</i>	2774	<i>Sorghum bicolor</i>	Birigui SP	Set/2013	2
<i>F. proliferatum</i>	2776	<i>Sorghum bicolor</i>	Rondonópolis MT	Jul/2013	2
<i>F. proliferatum</i>	2777	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Jul/2013	2
<i>F. proliferatum</i>	2779	<i>Sorghum bicolor</i>	São Gabriel do Oeste MS	Jul/2013	2
<i>F. proliferatum</i>	2782	<i>Sorghum bicolor</i>	Lavras MG	Mai/2013	2
<i>F. proliferatum</i>	2810	<i>Sorghum bicolor</i>	Jaraguá GO	Ago/2013	2
<i>F. proliferatum</i>	2811	<i>Sorghum bicolor</i>	Maurilândia GO	Ago/2013	2
<i>F. proliferatum</i>	2825	<i>Sorghum bicolor</i>	Birigui SP	Jan/2014	2
<i>F. proliferatum</i>	770	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	-	2
<i>F. proliferatum</i>	771	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	-	1
<i>F. thapsinum</i>	2739	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Nov/2013	2
<i>F. thapsinum</i>	2741	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Nov/2013	1
<i>F. thapsinum</i>	2745	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Nov/2011	2
<i>F. thapsinum</i>	2748	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Mar/2012	2
<i>F. thapsinum</i>	2753	<i>Sorghum bicolor</i>	Chapadão do Sul MS	Fev/2013	1

Tabela 1, Continua

Espécie	Código CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Data do isolamento	MAT
<i>F. thapsinum</i>	2765	<i>Sorghum bicolor</i>	Rio Verde GO	Jun/2013	1
<i>F. thapsinum</i>	2766	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Set/2013	1
<i>F. thapsinum</i>	2781	<i>Sorghum bicolor</i>	São Gabriel do Oeste MS	Jul/2012	2
<i>F. thapsinum</i>	2798	<i>Sorghum bicolor</i>	Paracatu MG	Jul/2012	2
<i>F. thapsinum</i>	2806	<i>Sorghum bicolor</i>	Uruaçu GO	Ago/2013	1
<i>F. thapsinum</i>	2814	<i>Sorghum bicolor</i>	Indianópolis MG	Jan/2014	2
<i>F. thapsinum</i>	2818	<i>Sorghum bicolor</i>	Jardinópolis SP	Jan/2014	2
<i>F. thapsinum</i>	774	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	-	2
<i>F. thapsinum</i>	775	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	-	1
<i>F. verticillioides</i>	2743	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Nov/2011	2
<i>F. verticillioides</i>	2747	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Abr/2012	1
<i>F. verticillioides</i>	2749	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Jun/2012	2
<i>F. verticillioides</i>	2750	<i>Sorghum bicolor</i>	Lavras MG	Mai/2012	2
<i>F. verticillioides</i>	2751	<i>Sorghum bicolor</i>	Rio Verde GO	Set/2012	2
<i>F. verticillioides</i>	2752	<i>Pennisetum amaericanum</i>	Luiz Ed. Magalhães BA	Set/2012	2
<i>F. verticillioides</i>	2757	<i>Sorghum bicolor</i>	Paracatu MG	Ago/2012	1
<i>F. verticillioides</i>	2759	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Mai/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2760	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas MG	Mai/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2764	<i>Sorghum bicolor</i>	Uberlândia MG	Fev/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2767	<i>Sorghum bicolor</i>	Lavras MG	Nov/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2771	<i>Sorghum bicolor</i>	Rondonópolis MT	Ago/2012	2
<i>F. verticillioides</i>	2772	<i>Sorghum bicolor</i>	Rondonópolis MT	Jul/2012	2
<i>F. verticillioides</i>	2773	<i>Sorghum bicolor</i>	Indianópolis MG	Ago/2013	2

Tabela 1, Conclusão

Espécie	Código CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Data do isolamento	MAT
<i>F. verticillioides</i>	2775	<i>Sorghum bicolor</i>	São Gabriel do Oeste MS	Jul/2013	1
<i>F. verticillioides</i>	2778	<i>Sorghum bicolor</i>	Rondonópolis MT	Jul/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2784	<i>Sorghum bicolor</i>	Birigui SP	Mai/2013	1
<i>F. verticillioides</i>	2785	<i>Sorghum bicolor</i>	Luiz Ed. Magalhães BA	Ago/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2786	<i>Pennisetum amaericanum</i>	Sete Lagoas MG	Ago/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2788	<i>Pennisetum amaericanum</i>	Luiz Ed. Magalhães BA	Jul/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2789	<i>Pennisetum amaericanum</i>	Luiz Ed. Magalhães BA	Ago/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2790	<i>Pennisetum amaericanum</i>	Luiz Ed. Magalhães BA	Ago/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2792	<i>Sorghum bicolor</i>	Chapadão do Sul MS	Jul/2013	1
<i>F. verticillioides</i>	2794	<i>Sorghum bicolor</i>	Luiz Ed. Magalhães BA	Jul/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2795	<i>Sorghum bicolor</i>	Chapadão do Sul MS	Set/2013	2
<i>F. verticillioides</i>	2799	<i>Sorghum bicolor</i>	Indianópolis MG	Set/2012	2
<i>F. verticillioides</i>	2816	<i>Sorghum bicolor</i>	Indianópolis MG	Jan/2014	1
<i>F. verticillioides</i>	2819	<i>Sorghum bicolor</i>	Chapadão do Sul MS	Jan/2014	1
<i>F. verticillioides</i>	766	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	-	1
<i>F. verticillioides</i>	767	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	-	2

Nota: Abreviação da coleção de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; Outras Abreviações: **MAT**: *Mating type* dos isolados identificados por PCR. *MAT-1* = 1; *MAT-2* = 2.

2.2 Sequenciamento e análises filogenéticas

Para identificação dos isolados, foi realizado o sequenciamento de fragmentos do gene *fator de alongação 1- α* (*tef1- α*) a partir de todos os isolados monospóricos de *Fusarium* obtidos de sorgo e depositados na CML. A extração do DNA foi feita a partir dos isolados crescidos em Meio Extrato de Malte 2% líquido por três dias a 100 rpm a temperatura ambiente em um agitador orbital, para a produção de biomassa. A biomassa foi filtrada e o DNA foi extraído utilizando o kit de extração de DNA Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A seguir, realizou-se a amplificação e sequenciamento dos isolados para avaliação da diversidade genética entre isolados de uma mesma espécie e entre diferentes espécies.

A amplificação do gene *fator de alongação 1- α* foi realizada utilizando os *primers* Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') gerando um fragmento de aproximadamente 600 pb (O'Donnell et al. 1998). As reações de PCR foram realizadas como descrito por O'Donnell et al. (1998).

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa MACROGEN. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem (Hepperle, 2004) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio da ferramenta BLAST (<http://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>).

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de *Máxima parcimônia*, através do programa MEGA 5. Sequências de referência correspondente ao gene *tef1- α* de espécies do FFSC depositadas no GenBank,

também foram acrescentadas às análises, *F. inflexum* foi utilizado como *outgroup* (Tabela 2).

Tabela 2 Sequências de espécies do FFSC correspondentes a região gênica *tef1- α* depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Código	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Tef
<i>F. andiyazi</i> T	CBS 119857	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	KR071718
<i>F. andiyazi</i>	CBS 134430	Humano (neoplasia)	Turquia	KR071721
<i>F. andiyazi</i>	CBS 256.93	<i>Macadamia ternifolia</i>	Cuba	KR071719
<i>F. brevicatenulatum</i> T	NRRL 25446	<i>Striga asiatica</i>	Madagascar	AF160265
<i>F. fractiflexum</i>	NRRL 28852	<i>Cymbidium</i> sp.	Japão	AF160288
<i>F. fujikuroi</i>	NRRL 13566	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan	AF160279
<i>F. globosum</i>	NRRL 26131	<i>Zea mays</i>	África do Sul	AF160285
<i>F. inflexum</i> T	NRRL 20433	<i>Vicia faba</i>	Alemanha	AF8479
<i>F. mangiferae</i>	NRRL 25226	<i>Mangifera indica</i>	Índia	AF160281
<i>F. musae</i>	NRRL 25059	<i>Musa</i> sp.	Honduras	FN552086
<i>F. nygamai</i> T	NRRL 13448	<i>Sorghum bicolor</i>	Austrália	AF160273
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22944	<i>Cattleya</i> sp.	Alemanha	AF160280
<i>F. pseudoanthophilum</i>	NRRL 25206	<i>Zea mays</i>	Zimbábue	AF160264
<i>F. pseudonygamai</i> T	NRRL 13592	<i>Pennisetum typhoides</i>	Nigéria	AF160263
<i>F. sacchari</i>	NRRL 13999	<i>Saccharum officinarum</i>	Índia	AF160278
<i>F. subglutinans</i>	NRRL 22016	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	AF160289
<i>F. temperatum</i>	MUCL 52450	<i>Zea mays</i>	Bélgica	HM067687
<i>F. thapsinum</i>	NRRL 22045	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	AF160270
<i>F. tuiense</i> T	CML 262	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	DQ452859
<i>F. verticillioides</i>	MUCL 43479	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	FN54360

Nota: Abreviações das coleções de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; **MUCL**: Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium; **NRRL**: Northern Regional Research Laboratory, NCAUR, Peoria, Illinois; **CBS**: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. Outras Abreviações: **Tef**: Fator de elongação 1- α ; **T**: isolado tipo.

2.3 Determinação de *mating types* e teste de compatibilidade sexual

Para a determinação de *mating types* foi feita amplificação de um fragmento de ~200 pb do idiomorfo *MAT-1* por meio dos *primers* GFmat1a (senso; 5'-GTTCATCAAAGGGCAAGCG-3') e GFmat1b (antisenso; 5'-TAAGCGCCCTCTTAACGCCTTC -3') e um fragmento de ~260 pb do idiomorfo *MAT-2*, utilizando os *primers* *fusHMGfor* (senso; 5'-CGACCTCCCAAYGCTACAT -3') e *fusHMGrev* (antisenso; 5'-TGGGCGGTACTGGTARTCRGG -3'). As condições da reação do alelo *MAT-1* foi de acordo com Steenkamp et al. (2000) e para o alelo *MAT-2* foi de acordo com Kerényi et al. (2004).

No teste de compatibilidade sexual, isolados testadores de *F. verticillioides* (KSU00149 *MAT-1* e KSU00999 *MAT-2*), *F. thapsinum* (KSU04094 *MAT-1* e KSU04093 *MAT-2*) e *F. proliferatum* (KSU04854 *MAT-1* e KSU04853 *MAT-2*) foram cruzados com os isolados obtidos nesse trabalho, para a identificação de espécie biológica.

Os cruzamentos foram realizados de acordo com a metodologia padrão para estudo de compatibilidade sexual do FFSC (Leslie e Summerell, 2006). Os isolados utilizados como parental feminino, foram transferidos para placas de Petri contendo meio Cenoura-ágar e incubados por sete dias, no escuro, a 25°C. Os isolados utilizados como parental masculino foram transferidos para tubos contendo Meio Completo (CM) e incubados por sete dias sob fotoperíodo de 12 horas a 20°C. Após esse período, foi adicionado aos tubos 2 mL de solução Tween 80 2,5% (v/v) e o micélio aéreo foi friccionado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, formando uma suspensão concentrada de esporos. A suspensão de esporos foi transferida para uma placa contendo o isolado de *mating type* oposto, e espalhada pela superfície da placa com uma alça de Drigalski. Os cruzamentos foram incubados a 20°C, sob fotoperíodo de 12 horas

e foram avaliados semanalmente durante 6 semanas. Cruzamentos foram considerados férteis quando produziram peritécios, que exsudam ascósporos.

A viabilidade dos ascósporos foi verificada pelo teste de germinação em Ágar-água 2%. Com auxílio de um estilete de ponta fina, cirros de ascósporos foram coletados e espalhados sobre a superfície do meio de cultura com uma alça de Drigalski e algumas gotas de água estéril. Posteriormente, a placa de Petri contendo os ascósporos foi incubada no escuro, a 25 °C, por 24 horas. Após este período de incubação, foi realizada a avaliação da germinação dos ascósporos em microscópio de luz sob aumento de 40 vezes.

2.4 Caracterização morfológica

A caracterização e identificação dos isolados foram realizadas a partir do protocolo descrito por Leslie e Summerell (2006). Isolados monospóricos foram crescidos em placas de Petri contendo meio de Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 25°C, no escuro por 4 dias, para observação da taxa de crescimento e após 10 dias para avaliação da coloração da colônia. As características micromorfológicas como tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides; presença de clamidósporos e produção de microconídios em cadeias ou falsas cabeças, foram avaliadas em *Synthetic Nutrient-poor Agar* (SNA) a 20°C, sob fotoperíodo com luz branca fluorescente, após um período de 10 a 14 dias de incubação. Para indução da esporulação dos isolados, folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) estéreis foram transferidas para as colônias cultivadas em SNA. Entre 10 e 14 dias após a incubação dos isolados foi realizada a avaliação. Para cada isolado, foram realizadas três repetições. Foram tomadas medições das estruturas vegetativas e comparadas com descrições na literatura.

2.5 Perfil de micotoxinas dos isolados

A habilidade das espécies em produzir FB₁, FB₂ e MON foi determinada pelo crescimento de 20 isolados representativos, selecionados a partir de diferentes regiões geográficas do Brasil, em frascos Erlenmeyeres contendo canjiquinha de milho com 40% de umidade conforme metodologia descrita por Chulze et al. (1999). O milho foi inoculado com discos de ágar coletados a partir da margem das colônias de cada isolado crescido por 7 dias em meio SNA. Os frascos Erlenmeyeres foram incubados a 25 °C por 28 dias. Após a incubação, o material da cultura foi seco em estufa de ventilação forçada a 60 °C por 48 h e posteriormente moído e armazenado a 4°C até o uso.

A análise de fumonisinas (FB₁ e FB₂) foi baseada no método de Shephard et al. (1990) modificado por Doko et al. (1995), no qual 15 g da amostra moída foi misturada com 50 ml de metanol:água (3:1) por 30 min e filtrado através de papel filtro Whatman N°4 para extrair a toxina. Alíquotas dos extratos foram purificadas usando cartuchos SAX (*solid-phase strong anion-exchange*). Os cartuchos foram lavados para remover substâncias interferentes potenciais, e as fumonisinas foram seletivamente eluídas. Uma alíquota do eluído (50 µl) foi derivatizada com 200 µl de solução de *orto*-ftaldialdeído (OPA) (obtida pela adição de 5 ml de tetraborato de sódio 0.1 M e 50 µl de 2-mercaptoetanol para 1 ml de metanol contendo 40 mg de OPA).

Os derivados de fumonisina foram analisados usando HPLC de fase reversa acoplado com um sistema de detecção fluorescente. Para a fase móvel foi usado metanol: 0.1 M, dihidrogenofosfato de sódio (75:25) solução ajustada para pH 3.35 com ácido ortofosfórico a uma taxa de fluxo de 1.5 ml/min. A fluorescência dos derivados de fumonisina foi registrada a excitação e emissão do comprimento de onda de 335 e 440 nm, respectivamente. As fumonisinas foram medidas com a altura dos picos e comparada com soluções dos padrões de

referência de FB₁ e FB₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Para a curva de calibração, 4 soluções foram preparadas (0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 µg/ml) pela diluição de uma alíquota da solução estoque de fumonisinas (50 µg/ml cada) com o volume apropriado de acetonitrila: água (1:1, v/v). O tempo de retenção da FB₁ e FB₂ foram 7.5 e 16.7 min, respectivamente. O limite de detecção do método analítico para as duas fumonisinas foi 1 µg/g.

A análise de moniliformina foi baseada no método de Parich et al. (2003) com pequenas modificações. Misturou-se 10 g da amostra moída com 50 ml de acetonitrila: água (84:16) por 60 min e em seguida foi filtrado através de papel filtro Whatman N°4. Alíquotas dos extratos (5 ml) foram purificadas com colunas de imunoafinidade MycoSep[®] 240 MON (Romer Labs[®]) de acordo com as recomendações do fabricante. Então, 100 µl de cada extrato foram totalmente evaporados sob uma corrente de gás nitrogênio e temperatura (< 40 °C). O extrato evaporado foi redissolvido com 100 µl da solução de fase móvel.

A análise foi realizada usando HPLC de fase reversa com detector UV a 228 nm. A separação foi realizada com coluna C18 (150 x 2.1 mm, 5 µm) usando como fase móvel um tampão de par iônico (10 ml de solução de par iônico e 50 ml de acetonitrila foram diluídos com água para 1000 ml) a um fluxo de 1 ml/min, e o tempo de retenção da MON nessas condições foi 6.5 min. As concentrações de MON foram medidas como o comprimento dos picos e comparadas com soluções padrão de referência. Para a curva de calibração, soluções de diferentes concentrações foram preparadas pela diluição de uma alíquota da solução estoque de MON com volume apropriado de fase móvel. O limite de detecção para esse método analítico foi 1 µg/g.

2.6 Teste de patogenicidade em colmos de sorgo, milho e milho

Os experimentos de patogenicidade foram realizados em casas-de-vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, no período de dezembro de 2014 a Fevereiro de 2016. Foram selecionados vinte isolados representantes das espécies *F. andiyazi* (6), *F. proliferatum* (4), *F. thapsinum* (4), e *F. verticillioides* (6), provenientes de sorgo, mas também de milho e milho, para serem inoculados em colmos de dois cultivares de sorgo (BR 304 e DKB 551), dois de milho (BRS 1040 e 30F35Y) e um de milho (BRS 1501). A inoculação foi feita seguindo o método do palito imerso proposto por Damicone et al. (1988).

As sementes dos cultivares foram semeadas em vasos perfurados com a capacidade de 5 L, contendo solo. Após semeadura os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação e distribuídos ao acaso sobre bancadas. As plantas foram inoculadas 45 dias após o plantio, no terceiro entrenó previamente desinfestado com álcool 70%, usando palito imerso na suspensão de esporos (10^6 conídios/mL) obtida a partir dos isolados cultivados em meio BDA durante 1 semana a 25 °C, fotoperíodo. Plantas de cada cultivar perfuradas apenas com palito estéril foram utilizadas como testemunha. Os palitos foram mantidos no local até o dia da avaliação.

A avaliação da severidade da podridão de colmo foi realizada 30 dias após a inoculação, por meio de corte longitudinal dos colmos. Cada um dos entrenós inoculados foi avaliado quanto à percentagem de infecção, com auxílio de uma escala diagramática com notas variando de 1 a 8 (Nicoli et al., 2015). Reisolamentos foram realizados a fim de recuperar os isolados representantes das espécies inoculadas e completar os postulados de Koch.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com três repetições por tratamento, sendo cada tratamento constituído de um vaso com

uma planta. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar (Ferreira, 2011).

3 RESULTADOS

3.1 Análise filogenética

As relações filogenéticas foram inferidas pelo método de *Máxima Parcimônia*. As sequências parciais do gene *tef-1 α* continham 148 sítios variáveis, 295 sítios conservados e 84 sítios parcimônia informativos. Todos os clados foram bem suportados com valores de *bootstrap* variando de 71% a 100%. As sequências dos isolados agruparam com sequências de referência de espécies já descritas e a árvore filogenética foi dividida em 4 clados principais I, II, III e IV. Os isolados de *F. andiyazi* se agruparam no clado I e este consistiu de dois subclados A e B. No subclado A se agruparam alguns isolados de *F. andiyazi* com os isolados tipo e de referência dessa espécie e no subclado B se agruparam os demais isolados de *F. andiyazi*. No clado II se agruparam os isolados da espécie *F. verticillioides*, no clado III isolados de *F. thapsinum* e no clado IV isolados de *F. proliferatum*.

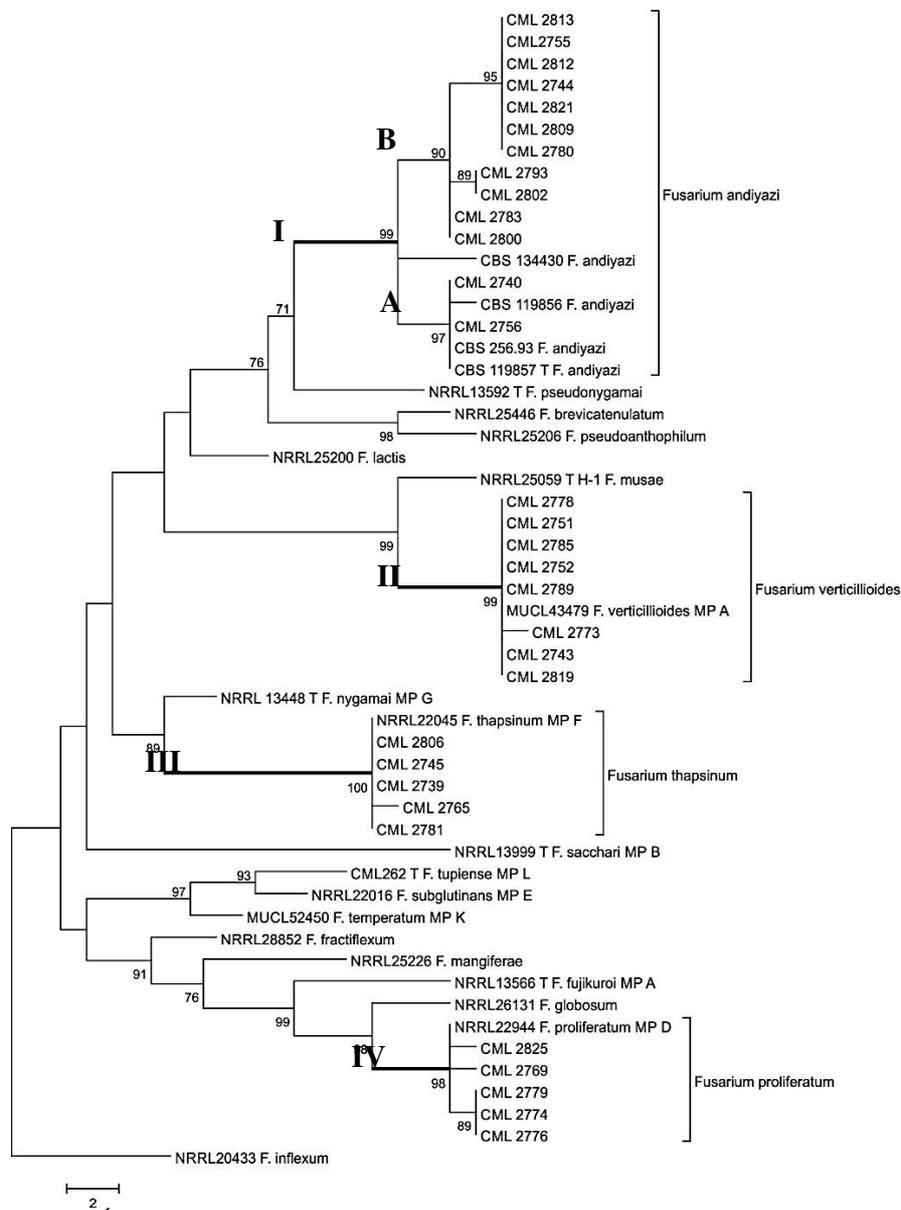


Figura 1 Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de seqüências do gene *tef-1a* dos isolados de *Fusarium* obtidos nesse trabalho e isolados de referência pertencentes ao *Gibberella fujikuroi* species complex. O Comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios.

3.2 Determinação de *mating types* e compatibilidade sexual

Os isolados das espécies *F. andiyazi*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides* apresentaram os dois idiomorfos *mating types*. Já os isolados da espécie *F. proliferatum* apresentaram apenas o idiomorfo *MAT-2* (Tabela 1). Cinco isolados de *F. proliferatum*, quatro de *F. thapsinum* e vinte e quatro de *F. verticillioides*, produziram peritécios férteis com seus respectivos isolados testadores, duas semanas após a realização dos cruzamentos (Figura 2). Os ascósporos exsudados pelos peritécios de todos os cruzamentos férteis de todas as espécies avaliadas mostraram-se viáveis, germinando após 12 horas de incubação.

3.3 Caracterização morfológica

Os caracteres macroscópicos e micromorfológicos da fase assexuada dos isolados das quatro espécies avaliadas foram de acordo com a descrição da literatura para essas espécies (Kuhlman, 1982; Klittich et al., 1997; Marasas et al., 2001; Leslie e Summerell, 2006).

As espécies apresentaram características micromorfológicas comuns como macroconídios contendo 3-6 septos, medindo 8,9-43 x 2,1-3,8 µm, retos ou ligeiramente curvados produzidos em monofiálides ou conidióforos ramificados e microconídios clavados a ovóides com base truncada, medindo 6-11,8 x 1,9-3µm, geralmente sem septos ou contendo 1-2 septos. Em *F. verticillioides* e *F. thapsinum* os microconídios foram formados em cadeias longas (Figura 2) a partir de monofiálides simples ou ramificadas e não foram produzidos clamidósporos e pseudoclamidósporos. *F. andiyazi* produziu microconídios em cadeias longas a partir de monofiálides e produziu pseudoclamidósporos (Figura 2). *F. proliferatum* produziu microconídios em

cadeias curtas a partir de mono e polifíalides (Figura 2) e não produziu clamidósporos e pseudoclamidósporos.

A taxa de crescimento micelial foi similar entre as espécies avaliadas variando de 18-48 mm em *F. andiyazi*, 28-37 mm em *F. thapsinum*, 30-41 mm em *F. proliferatum* e 35-45 mm em *F. verticillioides*. A pigmentação do reverso da colônia foi púrpura, creme, azul e salmão para *F. verticillioides*; amarelo (Figura 2), púrpura, creme e azul para *F. thapsinum*; azul, amarelo, púrpura, creme e salmão para *F. andiyazi* e azul, creme, púrpura e salmão para *F. proliferatum*.

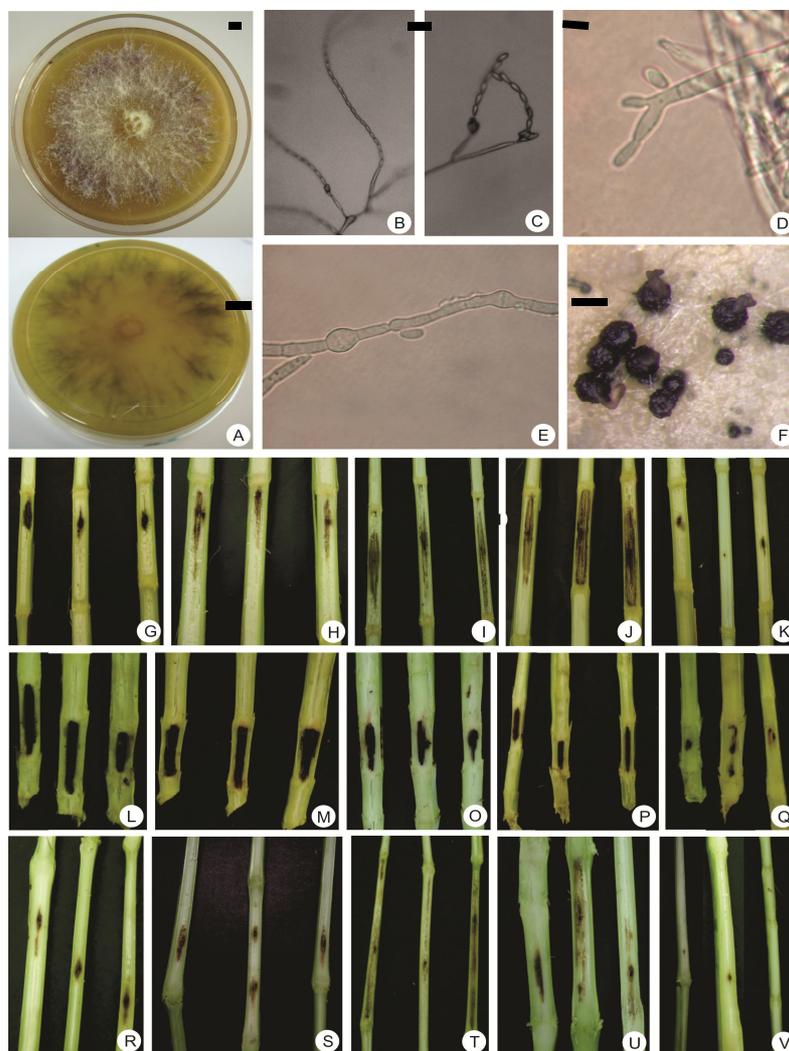


Figura 2 Marcadores morfológicos das espécies de *Fusarium*. A. Coloração amarela de *F. thapsinum*; B. Cadeias longas de microconídios de *F. verticillioides*. Barra = 20 μm ; C. Cadeias curtas, Barra = 20 μm e D. polifiálides, Barra = 10 μm de *F. proliferatum*; E. Pseudoclamidósporo de *F. andiyazi*. Barra = 10 μm ; F. Peritécios de *F. verticillioides* exsudando ascósporos. Barra = 300 μm ; G-K. Sintomas de *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e controle, respectivamente inoculados em milho. L-Q. Sintomas de *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e controle, respectivamente, inoculados em sorgo. R-V. Sintomas de *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e controle, respectivamente inoculados em milheto.

3.4 Perfil de micotoxinas dos isolados

A capacidade das quatro espécies de *Fusarium* associadas ao sorgo de produzir as micotoxinas moniliformina e fumonisinas (FB₁ e FB₂) é apresentada na Tabela 3. Altos níveis de MON foram produzidos por todos os isolados de *F. proliferatum* e *F. thapsinum*. Por outro lado, isolados de *F. verticillioides* produziram pouca ou nenhuma quantidade de MON. *F. andiyazi* apresentou variação na produção de MON, alguns isolados produziram essa micotoxina em altos níveis enquanto outros não produziram MON (Tabela 3).

Altos níveis de FB₁ foram produzidos por 5 dos 6 isolados de *F. verticillioides* e todos os isolados de *F. proliferatum* e *F. thapsinum*. *F. andiyazi* também apresentou variação quanto a produção de FB₁, dos 6 isolados analisados, 1 produziu pouca FB₁, quatro não produziram essa micotoxina e um isolado produziu alto nível de FB₁ (Tabela 3).

F. verticillioides foi a espécie que apresentou maior número de isolados produtores de FB₂, dos 5 isolados analisados, 4 produziram altos níveis dessa micotoxina. As demais espécies apresentaram apenas um isolado produtor de FB₂ (Tabela 3). As amostras de milho usadas como controle negativo, apresentaram apenas quantidades traço de FB₁ (3 ug/gr) e não apresentaram FB₂ e moniliformina.

Tabela 3 Micotoxinas produzidas pelas espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides* isoladas de sorgo no Brasil.

Espécie	Código	MON (ug/gr)^a	FB₁ (ug/gr)^b	FB₂ (ug/gr)^c
<i>F. andiyazi</i>	CML2821	ND	ND	ND
	CML2802	ND	ND	ND
	CML2783	ND	ND	ND
	CML2744	245,2	33,7	ND
	CML2793	1,6	775,4	556
	CML2800	219,5	ND	ND
<i>F. proliferatum</i>	CML2774	176,7	211	ND
	CML2776	26,8	205,5	ND
	CML2779	109,5	67,2	ND
	CML2825	42	575,6	659,5
<i>F. thapsinum</i>	CML2739	149,5	339,3	ND
	CML2781	149,9	250	364,6
	CML2806	45	50,7	ND
	CML2765	58,1	400	ND
	CML2745	40,6	24,9	ND
<i>F. verticillioides</i>	CML2819	ND	510,3	390
	CML2785	2,3	ND	ND
	CML2778	8,7	556,5	157
	CML2743	2,2	693,4	166,5
	CML2751	ND	574,2	459

^(a) Moniliformina, limite de detecção: 1 µg/g

^(b) Fumonisina B₁, limite de detecção: 1 µg/g

^(c) Fumonisina B₂, limite de detecção: 1 µg/g

ND: não detectado

3.5 Teste de patogenicidade em colmos de sorgo, milheto e milho

A reação dos cultivares as espécies de *Fusarium* foi similar nas duas repetições do experimento e os resultados são apresentados na Tabela 4. Lesões necróticas se desenvolveram nos entrenós dos colmos de milho, sorgo e milheto inoculados com os 20 isolados das espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides*. Não foram observadas lesões nos entrenós inoculados com o palito estéril (Figura 2).

Houve interação significativa ($p < 0.05$) entre os fatores espécie/cultivar e isolado/cultivar. Os isolados de *F. andiyazi* CML 2821, *F. proliferatum* CML 2774 e de *F. thapsinum* CML 2739 foram menos agressivos para o cultivar de milho BRS 1040 (média de 18,80% de entrenó infectado), assim como o isolado de *F. thapsinum* CML 2739 foi menos agressivo para o cultivar de milho 30F35Y e para o cultivar de milheto BRS 1501 (18,80%) (Tabela 4).

Por outro lado, altos índices de severidade foram observados em três isolados de *F. andiyazi* CML 2809 (72,97%), CML 2812 (72,97%) e CML 2813 (77,13%) para o cultivar de sorgo DKB551 e o isolado CML 2812 (60,47%) para o cultivar de milho BRS 1040. Para *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides* também foram observados isolados mais agressivos, sendo estes respectivamente, CML 2779 (72,97%) para o cultivar de milho 30F35Y, CML 2739 (68,80%) para o cultivar de sorgo DKB 551 e CML 2778 (89,63%) para o cultivar de milho 30F35Y (Tabela 4).

Na interação cultivar/espécie, *F. proliferatum* apresentou os menores valores de severidade para o cultivar de milho BRS 1040 (38,59%) e para os cultivares de sorgo BR 304 (50,05%) e DKB 551 (53,17%), assim como *F. thapsinum* apresentou os menores valores de severidade para os dois cultivares de milho BRS 1040 (38,59%) e 30F35Y (45,88%) e para o cultivar de milheto BRS 1501 (38,59%). Um comportamento similar foi observado em *F.*

verticillioides, que foi menos agressivo ao cultivar de milho BRS 1501 (38,59%) (Tabela 4).

Com relação aos maiores valores de severidade, *F. andiyazi* foi mais agressivo para o cultivar de sorgo DKB 551 (59,77%), *F. proliferatum* foi mais agressivo para o cultivar de milho 30F35Y (56,30%), *F. thapsinum* foi mais agressivo para o cultivar de sorgo DKB 551 (60,46%) e *F. verticillioides* foi mais agressivo para o cultivar de milho 30F35Y (64,63%).

Para a interação cultivar de milho/espécie observou-se que o cultivar BRS1040 foi mais resistente a todas as espécies analisadas que o cultivar 30F35Y. E para interação cultivar de sorgo/espécie, o cultivar BR 304 foi mais resistente do que o DKB 551 para todas as espécies analisadas (Tabela 4).

De acordo com os níveis de severidade, não foi possível estabelecer uma relação de especificidade entre hospedeiro de origem e isolado inoculado, pois nem sempre um isolado obtido de um determinado hospedeiro foi mais agressivo ao mesmo. Isso foi evidenciado no isolado CML 2812 proveniente de milho que foi agressivo ao cultivar de milho BRS 1040 (60,47%), mas também foi altamente agressivo para o cultivar de sorgo DKB 551 (72,97%). O outro isolado de *F. andiyazi* proveniente de milho (CML 2813) foi estatisticamente semelhante aos isolados de *F. andiyazi* provenientes de sorgo no cultivar de milho BRS 1040, entretanto, foi mais agressivo que os isolados de sorgo no cultivar de sorgo DKB 551 (77,13%) (Tabela 4). O isolado proveniente de milho CML 2789 apresentou altos valores de severidade para os cultivares de milho e sorgo, no entanto, apresentou baixa severidade para o cultivar de milho (22,97%) (Tabela 4). Em todos os reisolamentos realizados nos colmos das cultivares de milho, sorgo e milho, isolados de todas as espécies foram recuperados, completando os postulados de Koch.

Tabela 4 Média de severidade dos isolados de *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides*, inoculados em colmos de milho, sorgo e milheto. (Continua)

Isolado	Cultivar									
	BRS1040		30F35Y		BR304		DKB551		BRS1501	
<i>F. andiyazi</i>										
CML2744	47,97	Db	56,30	Db	52,13	Bb	43,80	Ba	35,47	Ca
CML2783	49,77	Da	60,47	Da	52,13	Ba	47,97	Ca	60,47	Da
CML2809	43,80	Da	43,80	Ca	47,97	Ba	72,97	Ec	60,47	Db
CML2821	18,80	Ba	60,47	Dc	68,80	Cc	43,80	Bb	35,47	Cb
CML2812	60,47	Eb	56,30	Da	47,97	Ba	72,97	Eb	64,63	Db
CML2813	43,80	Da	56,30	Da	60,47	Ca	77,13	Eb	52,13	Da
Média da espécie	44,10	Ca	55,60	Cc	54,91	Cc	59,77	Cd	51,43	Db
<i>F. proliferatum</i>										
CML2769	47,97	Db	43,80	Cb	43,80	Bb	64,63	Dc	31,30	Ca
CML2774	18,80	Ba	56,30	Dc	43,80	Bb	60,47	Dc	22,97	Ba
CML2776	52,13	Db	52,13	Cb	56,30	Cb	35,47	Ba	60,47	Db
CML2779	35,47	Da	72,97	Ec	56,30	Cb	52,13	Cb	58,17	Db
Média da espécie	38,59	Ba	56,30	Cd	50,05	Bc	53,17	Be	43,22	Cb
<i>F. thapsinum</i>										
CML2739	18,80	Ba	18,80	Ba	64,63	Cb	68,80	Eb	18,80	Ba
CML2765	43,80	Da	64,63	Db	56,30	Cb	56,30	Cb	52,13	Da
CML2781	43,80	Da	39,63	Ca	47,97	Ba	60,47	Db	31,30	Ca
CML2806	47,97	Da	60,47	Da	56,30	Ca	56,30	Ca	52,13	Da
Média da espécie	38,59	Ba	45,88	Bc	56,30	Cb	60,46	Cd	38,59	Ba

Tabela 4, Conclusão

Isolado	Cultivar									
	BRS1040		30F35Y		BR304		DKB551		BRS1501	
<i>F. verticillioides</i>										
CML2752	31,30	Ca	43,80	Cb	60,47	Cc	52,13	Cc	31,30	Ca
CML2773	52,13	Db	64,63	Db	56,30	Cb	47,97	Cb	32,87	Ca
CML2778	60,47	Eb	89,63	Fc	60,47	Cb	43,80	Ba	56,30	Db
CML2785	52,13	Da	60,47	Db	47,97	Ba	49,77	Ca	64,63	Db
CML2789	68,80	Eb	64,63	Db	52,13	Bb	60,47	Db	22,97	Ba
CML2819	39,63	Db	64,63	Dd	43,80	Bb	52,13	Cc	22,97	Ba
Média da espécie	50,74	Da	64,63	Dc	53,52	Cb	51,04	Bd	38,50	Bb
Testemunha	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa

Nota: Médias seguidas por mesma letra minúscula entre as linhas ou letras maiúsculas entre as colunas não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$)

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a partir de uma ampla coleção de isolados de *Fusarium* obtidos de grãos de sorgo provenientes de diferentes regiões do Brasil, uma avaliação polifásica usando dados morfológicos, biológicos e filogenéticos revelou que existem quatro espécies do FFSC associadas a grãos de sorgo no Brasil: *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Essas espécies foram toxigênicas, produzindo fumonisinas e/ou moniliformina em testes *in vitro* e, além disso, devem ser consideradas como patógenos e não meramente como endofíticos ou saprófitas, pois causaram sintomas de podridão de colmo em sorgo, milho e milho.

A frequência de ocorrência das quatro espécies de *Fusarium* variou entre as diferentes regiões do Brasil. As espécies *F. andiyazi* e *F. verticillioides* foram predominantes e foram identificadas na maioria das regiões produtoras de sorgo, seguidas por *F. thapsinum* e *F. proliferatum*. Essas espécies têm sido relatadas associadas ao sorgo em outros países, no entanto, em contraste com os resultados deste trabalho, a espécie *F. thapsinum* predomina em países como Índia (Sharma et al., 2011), Uganda (Prom et al., 2011) e Coreia (Choi et al., 2011). As espécies *F. verticillioides*, *F. thapsinum* e *F. proliferatum* já foram descritas associadas a grãos de sorgo no estado de São Paulo (Dos Reis et al., 2010; Da Silva et al., 2004, 2006), contudo, esse é o primeiro registro da ocorrência da espécie *F. andiyazi* associada a grãos de sorgo no Brasil.

Neste trabalho as quatro espécies foram definidas como espécies filogenéticas por meio da análise de sequências parciais do gene *Tef 1-α*. Na árvore filogenética, o clado de *F. andiyazi* apresentou dois grupos distintos, mostrando variabilidade genética dentro da espécie. A variabilidade genética de *F. andiyazi* também foi observada por Bushula et al. (2015), no qual isolados de *F. andiyazi* obtidos de sorgo em Kansas, Camarões e Uganda se separaram em

três *clusters* e em duas subpopulações na análise de AFLP. Segundo esses autores pode existir um ou até dois grupos que representam um táxon irmão de *F. andiyazi* que ainda não foi adequadamente descrito e definido.

Isolados de *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides* também foram definidos como espécies biológicas por meio de cruzamentos em laboratório, que resultaram na formação de peritécios férteis com os isolados testadores destas espécies. Até o momento, não se conhece a fase sexual de *F. andiyazi* e de acordo com a literatura esta espécie tem baixa fertilidade (Leslie et al. 2005). Como isolados de ambos os *mating types* foram obtidos neste trabalho, cruzamentos de laboratório podem ser conduzidos a fim de obter a fase sexual de *F. andiyazi*. O conhecimento sobre a reprodução sexual de fungos especialmente do gênero *Fusarium* é importante, pois além de ser uma ferramenta útil para identificação de espécies, a reprodução sexual pode afetar o controle de doenças de plantas uma vez que a variabilidade genética produzida por esse tipo de reprodução pode influenciar a resposta do fungo a práticas culturais, introdução de novos cultivares com diferentes níveis de resistência ou a aplicação de fungicidas (Palacios et al., 2015).

Existem alguns marcadores morfológicos que permitem diferenciar as espécies. Embora tenham morfologia igual, *F. thapsinum* é distinguido de *F. verticillioides* pela produção de pigmento amarelo. A espécie *F. proliferatum* se caracteriza pela presença de cadeias curtas de microconídios a partir de polifialides. Já *F. andiyazi* apresentou como marcador morfológico a presença de pseudoclamidósporos. Não foram observados morfotipos entre os isolados de *F. andiyazi* pertencentes aos dois grupos que justifiquem a separação dos isolados na árvore filogenética.

As espécies identificadas nesse trabalho foram capazes de produzir fumonisinas e moniliformina em testes *in vitro*. Os níveis de ambas micotoxinas produzidas por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* foram consistentes com os

observados por outros autores para essas espécies (Da Silva et al., 2004; Leslie et al., 2005; Sharma et al., 2011). É importante ressaltar que *F. thapsinum* produziu altos teores de fumonisinas, embora esta espécie seja relatada em outros trabalhos como não produtora dessas micotoxinas (Leslie et al., 2005; Leslie e Summerell, 2006). Situação similar foi observada para os isolados de *F. andiyazi* pertencentes ao clado B que produziram fumonisinas e moniliformina sendo a espécie também relatada como não produtora de ambas micotoxinas (Leslie et al., 2005; Leslie e Summerell, 2006). No entanto, a produção de fumonisinas por essas duas espécies também pode variar. Foi sugerido que as espécies *F. andiyazi* e *F. thapsinum* obtidas de grãos de sorgo na Índia produzem fumonisinas, mas nenhuma identificação de espécie confiável foi fornecida (Sharma et al., 2011). De acordo com Proctor et al. (2004), o *cluster* de genes *FUM* responsável pela síntese de fumonisinas é distribuído descontinuamente dentro do FFSC. Assim, a presença dos genes *FUM* e a habilidade de produzir fumonisinas pode variar dentro de uma espécie.

Estudos sobre a ocorrência de espécies produtoras de moniliformina em sorgo ou outras gramíneas não tem sido realizados com frequência. Desta forma, este é o primeiro relato de isolados de *F. andiyazi* produtores de moniliformina. Vale destacar que os isolados de *F. andiyazi* que produziram fumonisinas e moniliformina pertencem ao clado B, assim, mais pesquisas são necessárias para verificar se isolados do clado A produzem essas micotoxinas e se esta característica pode ser utilizada para diferenciar as duas populações.

As espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum* já foram relatadas como produtoras de fumonisinas em sorgo no estado de São Paulo (Da Silva et al., 2004, 2006). No entanto, este é o primeiro registro da ocorrência das espécies *F. thapsinum* e *F. andiyazi* como produtoras de fumonisinas em sorgo no Brasil. Também é relatado pela primeira vez a produção de moniliformina por espécies de *Fusarium* no Brasil. Estes resultados indicam que fumonisinas e

moniliformina podem estar presentes não apenas em sorgo, mas também em outros cereais consumidos no país. Até o momento, não existe legislação disponível para a presença de fumonisinas e moniliformina em sorgo no Brasil. Porém, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os limites de 5000 µg/kg para fumonisinas (FB₁ +FB₂) em grãos de milho para posterior processamento e de 2000 µg/kg em produtos a base de milho (Anvisa, 2012).

Além de produzirem micotoxinas, as quatro espécies de *Fusarium* também foram capazes de causar podridão de colmo em sorgo, milho e milheto. Assim, os resultados da patogenicidade revelam as espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides* como patógenos dessas três culturas no país. A inespecificidade de hospedeiro dessas quatro espécies sugere que o cultivo de milho, sorgo e milheto próximos um do outro ou plantio alternado entre eles, pode aumentar o risco de ocorrência da podridão de colmo causada pelas espécies de *Fusarium* avaliadas.

Apesar de todas as espécies serem patogênicas, verificou-se que as espécies *F. thapsinum* e *F. andiyazi*, foram mais agressivas ao sorgo, enquanto *F. verticillioides* e *F. proliferatum* foram mais agressivas ao milho. As espécies *F. thapsinum* e *F. andiyazi* são comumente encontradas em sorgo em outras regiões do mundo e também foram confirmadas como os patógenos mais agressivos ao sorgo em outros estudos (Leslie et al., 2005; Tesso et al. 2005, 2010; Tesso e Ejeta, 2011). *F. verticillioides* é uma das espécies mais comum em milho no Brasil, onde é relatada causando podridão de grãos e colmo e produzindo fumonisinas (Lanza et al., 2014). *F. verticillioides* também foi relatado como mais agressivo ao milho do que *F. thapsinum* (Jardine e Leslie, 1999).

Os cultivares de milho e sorgo, mostraram reação diferenciada quanto a infecção com as espécies de *Fusarium*, sendo o cultivar de milho BRS 1040 e o

de sorgo BR 304 menos suscetíveis as quatro espécies inoculadas. Assim, a seleção de materiais em programas de melhoramento genético, com intuito de identificar novas fontes de resistência, se mostra viável e necessária para garantir proteção contra a podridão de colmo no Brasil. De acordo com Bandara et al. (2015), a resistência de plantas é uma das maneiras mais efetivas para a redução da podridão de colmo, porém, ainda tem sido um processo relativamente lento.

Com base nos resultados obtidos nessa pesquisa pode-se concluir que as espécies *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*, associadas a sorgo no Brasil, foram capazes de produzir fumonisinas e moniliformina e dessa forma, sua incidência deve ser cuidadosamente monitorada para garantir qualidade e segurança do sorgo produzido no país. Além disso, ficou evidente o potencial dessas espécies de causar podridão de colmo em cultivares de milho, sorgo e milheto. O cultivar de milho BRS 1040 e o de sorgo BR 304 apresentaram menor suscetibilidade a todas as espécies testadas e assim estratégias de manejo mostram-se viáveis e necessárias para o controle da podridão de colmo nessas culturas.

REFERÊNCIAS

ANVISA (2011) 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. Section 1, page 66.

Bandara, Y. M. A. Y, Perumal, R. and Little, C. R. 2015. Integrating resistance and tolerance for improved evaluation of sorghum lines against *Fusarium* stalk rot and charcoal rot. *Phytoparasitica* 43:485-499.

Borém, A., Pimentel, L. and Parrella, R. 2014. Sorgo do plantio a colheita. Viçosa, MG: Ed. UFV.

Bushula, V, Leslie, J. F. and Little, C. R. 2015. Genetic diversity in *Fusarium andiyazi* populations from sorghum. *Phytopathology* 105 (Suppl. 4):S4.21

Chala, A., Taye, W., Ayalew, A., Krska, R., Sulyok, M. and Logrieco, A. 2014. Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger millet (*Eleusine coracana* L. Garten) from Ethiopia. *Food Control* 45:29-35.

Choi, H., Hong, S., Kim, W., Lee, Y. and Chun, S. 2011. Diversity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with grain mold of sorghum in Korea. *Phytopathology* 101 (Suppl.) S36.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento (2015). Perspectivas para a Agropecuária. Volume 3 - Safra 2015/2016. Brasília, set. 2015, 130p.

Da Silva, J. B., Dilkin, P., Fonseca, H. and Corrêa, B. 2004. Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and fumonisins by *Fusarium* species isolated from brazilian sorghum. *Braz. J. Microbiol.* 35:182-186.

Da Silva, V. N., Fernandes, F. M. C., Cortez, A., Ribeiro, D. H. B., Almeida, A. P., Hasegawa, R. H. and Corrêa, B. 2006. Characterization and genetic variability of *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. *Can. J. Microbiol.* 52:798-804.

Damicone, P. J., Vineis, P. D. and Manning, W. J. 1988. Cross-Pathogenicity of *Fusarium moniliforme* isolates from corn and asparagus. *Plant Dis.* 14:774-777.

Doko, M. B., Rapior, S., Visconti, A. and Schjoth, J. E., Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. 1995. *J. Agric. Food Chem.* 43:429–434.

Dos Reis, T. A., Zorzete, P., Pozzi, C. R., da Silva, V. N., Ortega, E. and Corrêa, B. 2010. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *J. Sci. Food Agric.* 90:1445-1451.

EMBRAPA (2011). Cultivo do Sorgo. Sistemas de Produção. 7. ed. 2011. Available in: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo7_ed/index.htm

Ferreira, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039-1042.

Funnell-Harris, D. L., Pedersen, J. F. and Sattler, E. S. 2010. Alteration in lignina biosynthesis restricts growth of *Fusarium* spp. brown midrib sorghum. *Phytopathology* 100:671-681.

Hepperle, D. 2004. **SeqAssem**©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences: win32-version. Klein Raden: Sequentx, 2004. Available in: <http://www.sequentix.de>.

Jardine, D. J. and leslie, J. F. 1999. Aggressiveness to mature maize plants of *Fusarium* strains differing in ability to produce fumonisin. *Plant Dis.* 83:690-693.

Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B. and Hornok, L. 2004. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl. and Environ. Microb.* 70: 4419-4423.

Klittich, C. J. R., Nelson, P. E. and Marasas, W. F. O. 1997. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* 89: 643–652.

Kuhlman, E. G. 1982. Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 74:759–768.

Lanza, F. E, Zambolim, L., Costa, R.V., Queiroz, V. A.V., Cota, L. V., Silva, D. D., Souza, A. G. C. and Figueiredo, J. E. F. 2014. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. *Crop Prot.* 65:232-237.

Leslie, J. F., Zeller, K. A., Lamprecht, S. C., Rheeder, J. P. and Marasas, W. F. O. 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283.

Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Malden: Blackwell, USA, 420 p.

Leslie, F. F. and Logrieco, A. 2014. *Micotoxins reduction in grains chains*. Wiley-Blackwell, USA, 376 p.

Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P., Lamprecht, S. C. and Zeller, K. A. 2001. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia* 93:1203-1210.

Nicoli, A., Costa, R. V., Cota, L. V., Silva, D. D., Zambolim, L., Lanza, F. E., Guimarães, D. P. and Landau, E. C. 2015. Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose do colmo do milho. *Ciência Rural* 45:1720-1726.

O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

Palacios, S. A., Susca, A., Haidukowski, M., Stea, G., Cendoya, E., Ramírez, M. L., Chulze, S. N., Farnochi, M. C., Moretti, A. and Torres, A. M. 2015. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina. *Intern. J. of Food Microbiol.* 201:35-41.

Parich, A., Boeira, L. S., Castro, S. P. and Krska, R. 2003. Determination of moniliformin using SAX Column Clean-up and HPLC/DAD-detection. *Mycotoxin Res.* 19:203-206.

Proctor, R. H., Plattner, R. D., Brown, D. W., Seo, J. A., Lee, Y. W. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycol. Res.* 108:815-822.

Prom, L. K., Isakeit, T., Perumal, R., Erpelding, J. E., Rooney, W. and Magill, C. W. 2011. Evaluation of the Ugandan sorghum accessions for grain mold and anthracnose resistance. *Crop Prot.* 30:566-571.

Sharma, R., Thakur, R. P., Senthilvel, S., Nayak, S., Reddy, V., Rao, V. P. and Varshney, R. K. 2011. Identification and Characterization of Toxicogenic Fusaria

Associated with Sorghum Grain Mold Complex in India. *Mycopathologia* 171:223-230.

Sherphard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G. and Gelderblom, W. C. A. 1990. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescent detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13:2077-2087.

Steenkamp, E. T., Britz, H., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O. and Wingfield, M. J. 2000. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. *Mol. Plant Pathol.* 1:187-193.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molec. Biol. and Evol.* 28:2731-2739.

Tesso, T. T., Claflin, L. E. and Tuinstra, M. R. 2005. Analysis of stalk rot resistance and genetic diversity among drought tolerant sorghum genotypes. *Crop Science* 45: 645-652.

Tesso, T. T., Ochanda, N., Little, C. R., Claflin, L. and Tuinstra, M. R. 2010. Analysis of host plant resistance to multiple *Fusarium* species associated with stalk rot disease in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Field Crops Research* 118:177-182.

Tesso, T. T. and Ejeta, G. 2011. Stalk strength and reaction to infection by *Macrophomina phaseolina* of brown midrib maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). *Field Crops Research* 120:271-275.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

CAPÍTULO 3 Produção de fumonisinas em sorgo pelas espécies *Fusarium andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*

Manuscrito preparado para submissão à revista PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira)

RESUMO

Um estudo em campo foi conduzido para expandir o conhecimento sobre a habilidade das espécies *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* em colonizar grãos de sorgo e de produzir fumonisinas e conhecer os danos provocados por essas espécies quanto à produtividade e a germinação de sementes. Panículas de três cultivares de sorgo BRS 308, BRS 310 e AG50A70 foram inoculadas com as quatro espécies no período da safrinha (2015) e da safra (2015/2016). Foram realizadas análises da incidência de *Fusarium* nos grãos, teste de germinação de sementes e avaliação da produtividade. Dados climáticos foram coletados no período dos dois experimentos. Os três cultivares de sorgo analisados foram susceptíveis a contaminação com as espécies avaliadas e o cultivar BRS 308 apresentou maiores médias de incidência de *Fusarium* nos grãos. Além disso, os isolados foram capazes de produzir fumonisinas em diferentes concentrações, sendo a espécie *F. proliferatum* a que produziu os maiores teores de fumonisinas em todos os cultivares analisados. As quatro espécies também afetaram negativamente a produção de grãos e *F. verticillioides* a taxa de germinação das sementes. Esses resultados sugerem que estas espécies podem afetar a produção de sorgo no Brasil, além de oferecerem risco de contaminação com fumonisinas. Desta forma torna-se necessário a realização de estudos complementares que visem o controle dessas espécies em sorgo e outras gramíneas cultivadas no país.

Palavras-chave: *Sorghum*. *Fusarium fujikuroi* species complex. Produção de micotoxinas.

ABSTRACT

A field study was conducted to expand the knowledge about the ability of *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* and *F. verticillioides* to colonize sorghum grains and produce fumonisin. Another aim was to discover the damage caused by these species to productivity and seed germination. Panicles of three sorghum cultivars, BRS 308, BRS 310 and AG50A70, were inoculated with the four species in the off-season period (2015) and during the harvest period (2015/2016). Analyses of the incidence of *Fusarium* in the grains, a seed germination test and an evaluation of productivity were performed. Climatic data were collected during the period of the two experiments. The three sorghum cultivars studied were susceptible to *Fusarium* contamination, and BRS 308 showed a higher average of incidence of *Fusarium* in the grain. In addition, the isolates were able to produce fumonisins in different concentrations, and out of all the analyzed cultivars, *F. proliferatum* produced the highest fumonisin levels. The four species also affected the production of grains, and *F. verticillioides* reduced the rate of seed germination. These results suggest that these species can affect sorghum production in Brazil, in addition to posing a risk of fumonisin contamination. Thus it becomes necessary to carry out further studies aimed at controlling these species in sorghum and in other grasses cultivated in the country.

Keywords: *Sorghum*. *Fusarium species fujikuroi complex*. Production of mycotoxins.

1 INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é o quinto cereal mais cultivado no mundo, sendo particularmente importante em ambientes quentes e secos, onde é usado para substituir culturas mais sensíveis as variações ambientais. Atualmente o Brasil está entre os 10 maiores produtores de grãos de sorgo no mundo e a cultura está expandindo cada vez mais, principalmente no período de safrinha, em sucessão as culturas de verão (Embrapa, 2011; Borém et al., 2014; Conab, 2016). Em 2015 o estado de Goiás liderou a produção nacional de sorgo granífero com 851,1 mil toneladas, aumento de mais de 20% em relação à safra anterior, seguido por Minas Gerais (497,5 mil toneladas) e Mato Grosso (206,7 mil toneladas) (Conab, 2016). O principal uso do sorgo no país se destina à alimentação animal, sendo os grãos largamente utilizados em dietas caseiras e rações comerciais para monogástricos, ruminantes, peixes, crustáceos e pequenos animais domésticos. A planta inteira também é muito utilizada sob a forma de silagem ou forragem conservada, tanto para bovinos de leite como para gado de corte (Borém et al., 2014).

Espécies do *Fusarium fujjuroi species complex* (FFSC), causam diversas doenças em sorgo, incluindo podridões de colmo e raízes, além de mofamento dos grãos (Leslie et al., 2005). Esses fungos também podem ocorrer nos grãos como endófitos, sem causar sintomas de doença, porém, podem produzir micotoxinas que oferecem risco a saúde humana e animal. As espécies toxigênicas são capazes de contaminar os grãos durante várias fases da produção e processamento, especialmente sob condições de umidade e temperatura favoráveis (Dos Reis et al., 2010).

Entre as micotoxinas produzidas pelas espécies do FFSC, as fumonisinas são consideradas como uma das mais importantes, devido a sua alta incidência em diversos cereais, os altos níveis encontrados e sua toxicidade (Leslie et al.,

2005; Leslie e Logrieco, 2014). A exposição a fumonisinas pode causar efeitos adversos na saúde de animais e humanos, incluindo leucoencefalomalácia em equinos e edema pulmonar em suínos, além de estarem relacionadas a alta incidência de câncer de esôfago e defeitos no tubo neural em seres humanos (Fumero et al., 2016).

No Brasil, alguns trabalhos revelaram a presença de fumonisinas em amostras de sorgo (Da Silva et al., 2000; Da Silva et al., 2004; Dos Reis et al., 2010). Em um estudo anterior sobre a diversidade de espécies do FFSC associadas a grãos de sorgo em diferentes regiões do Brasil, as espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, e *F. verticillioides*, foram identificadas através de análises filogenéticas, marcadores morfológicos e compatibilidade sexual (Dados não publicados). Não estava claro se essas espécies produzem fumonisinas em sorgo e se afetam a produção de grãos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das espécies *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* de colonizar grãos de sorgo e de produzir fumonisinas totais e conhecer seu efeito na produtividade e germinação de sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados de *Fusarium* e cultivares testados

Foram utilizados quatro isolados, sendo um de *F. andiyazi* (CML 2821), um de *F. proliferatum* (CML 2774), um de *F. thapsinum* (CML 2765) e um de *F. verticillioides* (CML 2752), obtidos da Coleção Micológica de Lavras (CML), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

O experimento de campo foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, nos períodos de janeiro a maio de 2015 (safrinha)

e de dezembro de 2015 a abril de 2016 (safra). Foram utilizados três cultivares de sorgo: BRS 308, BRS 310 e AG 50A70.

Para o bom desenvolvimento da cultura foram realizadas adubações de plantio utilizando 350 kg.ha^{-1} da formulação 8-28-16 (N-P-K)+Zn e adubações de cobertura utilizando 150 kg.ha^{-1} de uréia aos 30 e 45 dias após o plantio. Também foi fornecida irrigação de acordo com a demanda da cultura e análise de evaporação de tanque classe A. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial (2 épocas de plantio x 3 cultivares x 4 espécies de *Fusarium* + testemunha não inoculada) com três repetições. As parcelas foram compostas por 4 linhas de 5 metros espaçadas em 0,7 metros entre si. Cada parcela foi constituída por um dos cultivares inoculados com uma espécie de *Fusarium*. Como testemunhas foram mantidas parcelas não inoculadas de cada cultivar.

2.2 Preparo do inóculo e inoculação

Para o preparo do inóculo, os quatro isolados foram cultivados em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) durante sete dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foi preparada uma suspensão de esporos contendo 10^6 conídios/mL. As inoculações foram realizadas quando as plantas alcançaram o estágio inicial de enchimento de grãos, 70 dias após o plantio. Em cada parcela foram inoculadas as panículas das duas linhas centrais, excluindo-se as quatro plantas das extremidades das linhas. Foi utilizado aspersor manual para pulverizar a suspensão de inóculo até atingir o ponto de escorrimento. Em seguida sacos plásticos com volume de 2L foram utilizados para cobrir as panículas durante 48 h para manter a umidade e favorecer o desenvolvimento dos isolados nos grãos. Os sacos foram retirados e as plantas mantidas no campo até a maturação fisiológica dos grãos, quando foi realizada a colheita.

2.3 Avaliação da produtividade e análise de sanidade dos grãos

As panículas foram colhidas manualmente e procedeu-se a contagem do número de panículas/parcela. Posteriormente, estas foram trilhadas e o peso e umidade dos grãos foram medidos para estimação da produtividade. Os valores de peso dos grãos por parcela foram corrigidos para 13% de umidade e expressos em kg/ha^{-1} . As amostras foram homogeneizadas e foi retirada uma subamostra de 500 g para realização análises de sanidade dos grãos, fumonisinas e teste de germinação de sementes.

A análise de sanidade foi feita por meio da avaliação da incidência de fungos nos grãos utilizando-se a metodologia de papel filtro com congelamento (Teste de Blotter). Para isso, cem grãos foram selecionados aleatoriamente na amostra e desinfestados superficialmente pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por cinco minutos e então lavados em água destilada estéril. Em seguida, cem grãos de cada amostra foram distribuídos em quatro caixas de germinação contendo papel filtro umedecido com ágar-água 5% (w/v) de acordo com Pinto et al. (2007). As caixas de germinação foram mantidas a temperatura ambiente sob luz contínua por 24h para estimular a germinação, e então transferidas para freezer $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h para inibir o processo de germinação. Após esse período, as caixas foram incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12h por 10 dias. A quantificação e identificação dos fungos foi baseada na morfologia de colônias, esporos, conidióforos e células conidiogênicas, com auxílio de microscópio estereoscópio e microscópio binocular.

2.4 Germinação de sementes

Para avaliação da germinação, cem sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel de germinação, previamente umedecidas com água destilada e posteriormente cobertas por uma folha, enroladas e colocadas em germinador a 25 °C. A avaliação foi realizada seis dias após a instalação do teste, conforme as regras para análises de sementes (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem de sementes mortas (não germinadas).

2.5 Análise de produção de fumonisinas

Para a determinação do teor de fumonisinas, aproximadamente 400 g de cada amostra foi acondicionada em sacos de papel Kraft e, em seguida, foram secas a 65 °C, por 72 horas, para homogeneização do teor de água. Após resfriamento, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de 50 mesh e em seguida foram homogeneizadas. A farinha obtida foi acondicionada em sacos de polietileno, fechados e armazenados a 18 °C até a utilização.

Para a extração de fumonisinas totais, 10 g da amostra moída foi acondicionada em Erlenmeyer de 250 ml e então adicionados 1 g de NaCl e 20ml de metanol 80% e em seguida homogeneizados em agitador orbital por 2 minutos. O extrato foi filtrado em papel qualitativo para retirada de impurezas, e em seguida foi retirada uma alíquota de 5 ml. A esta alíquota foi adicionado 20 mL de PBS TWEEN – solução tampão. O extrato foi filtrado novamente em filtro de microfibras. Alíquotas dos extratos foram purificadas em colunas de imunoafinidade Fumonitest® (VICAM Inc. USA) de acordo com metodologia recomendada pelo fabricante. Imediatamente após a extração e purificação, as fumonisinas presentes nas amostras foram quantificadas em fluorímetro (VICAN). Os valores foram expressos em µg/kg.

2.6 Análises dos dados

Os experimentos foram analisados em esquema fatorial 2x3x5 (época de plantio x cultivares x espécie inoculada+testemunha não inoculada). As variáveis analisadas foram: produção de fumonisinas (µg/kg), incidência de *Fusarium* nos grãos (%), produtividade (kg/ha) e número de sementes mortas (%). Os dados foram submetidos a teste de normalidade e análise de variância, e

as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2011). Quando os dados não atenderam a normalidade, estes foram submetidos a transformação por meio da fórmula $ARCOSEN\sqrt{(x/100)}$. Também foi realizada uma análise de correlação entre as variáveis analisadas.

Dados de temperatura (mínima, média e máxima em °C), umidade relativa (%) e precipitação (mm), obtidos na estação meteorológica da Embrapa Milho e Sorgo foram coletados durante o período de condução dos experimentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de sanidade dos grãos

Por meio da análise de sanidade dos grãos verificou-se que em ambos experimentos, fungos do gênero *Fusarium* (46,6%) foram mais frequentes nos grãos de sorgo das três cultivares analisadas, seguido por *Phoma* sp. (17,51%), *Colletotrichum* sp. (13,18%), *Bipolaris* sp. (10,60%), *Curvularia* sp. (3,48%) e *Alternaria* sp. (1,1%). Fungos dos gêneros *Rizoctonia*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Penicillium* também foram encontrados, porém em baixa frequência (< que 1%).

De acordo com as análises estatísticas dos dados, para ambos experimentos, somente o fator cultivar, apresentou diferença significativa ($P < 0,05$). Os fatores época de plantio e espécie inoculada+testemunha ou a interação entre os fatores analisados, não apresentaram diferença. O cultivar BRS 308 apresentou a maior média de incidência de *Fusarium*, e o cultivar AG50A70 apresentou os menores valores de incidência (Tabela 1).

Tabela 1 Média da incidência de *Fusarium* nas cultivares AG 50A70, BRS 310 e BRS 308.

Genótipo	Incidência de <i>Fusarium</i> nos grãos (%)*
AG50A70	42,76 A
BRS310	45,43 AB
BRS308	51,73 B

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

A prevalência de espécies de *Fusarium* em sorgo tem sido relatada em diversas regiões como na Tunísia e Egito (Lahoaur et al., 2015), Argentina (González et al., 1997) e Etiópia (Chala et al., 2014). As espécies *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. andiyazi* e *F. sacchari* todas pertencentes ao *Fusarium fujikuroi species complex* são especialmente importantes, pois quando as condições ambientais são favoráveis, essas espécies causam podridão de colmo, mofamento de grãos ou produzem micotoxinas (Leslie et al., 2005; Dos Reis et al., 2010; Sharma et al., 2011; Petrovic et al., 2013). Além do gênero *Fusarium*, espécies dos gêneros *Curvularia*, *Alternaria*, *Phoma*, *Bipolaris*, *Drechslera* e *Colletotrichum* também são comumente detectadas em grãos de sorgo em várias partes do mundo (Prom et al., 2003; Frederiksen e Odvody, 2000), as quais também contribuem para a deterioração dos grãos nas fases de pré e pós-colheita.

A ocorrência de maiores médias de incidência de *Fusarium* nos grãos do cultivar BRS 308, indica que existe diferença de suscetibilidade. A variabilidade na incidência de *Fusarium* em grãos de diferentes genótipos de sorgo também foi relatada em outros trabalhos (Bodoci et al., 2013; Govardhan e Das, 2015).

3.2 Produção de fumonisinas

As espécies foram capazes de produzir fumonisinas em diferentes concentrações nos cultivares testados. Os dados de produção de fumonisinas não atenderam a normalidade, por isso foi usada a transformação de dados. Para ambos experimentos, somente os fatores época de plantio e espécie inoculada+testemunha, apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$). O fator cultivar ou a interação entre os fatores analisados, não apresentaram diferença. No geral, foi observado maiores teores de fumonisinas no experimento plantado na safrinha em relação ao experimento plantado na safra (Tabela 2).

Tabela 2 Média de fumonisinas totais nos experimentos plantados na safrinha e na safra.

Experimento	FUM ($\mu\text{g}/\text{kg}$)*
Safra	961,66 (0,28) A
Safrinha	1860,11 (0,42) B

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) para o fator espécie inoculada+testemunha, somente para a inoculação com a espécie *F. proliferatum* (Tabela 3). Para essa espécie foi observada maior média de teor de fumonisinas nos grãos em ambos experimentos. Para as demais espécies não houve diferença significativa quando comparadas à testemunha.

Tabela 3 Teores de fumonisinas dos três cultivares de sorgo inoculados com *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* e da testemunha não inoculada.

Espécie	FUM (µg/kg)*
<i>F. andiyazi</i>	826,94 (0,27) A
<i>F. thapsinum</i>	839,16 (0,28) A
Testemunha	910,27 (0,28) A
<i>F. verticillioides</i>	1022,5 (0,30) A
<i>F. proliferatum</i>	3455,55 (0,62) B

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

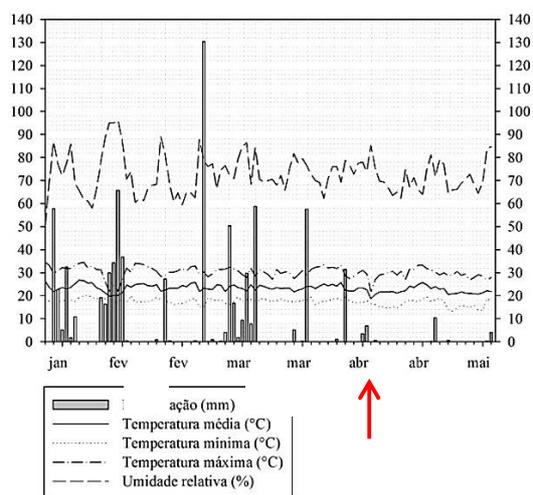
A detecção de maiores teores de fumonisinas nas amostras inoculadas com *F. proliferatum* indica que essa espécie é potencialmente produtora de fumonisinas em sorgo. As fumonisinas são produzidas em níveis significantes (>1µg/g) por relativamente poucas espécies pertencentes ao FFSC, sendo *F. verticillioides* e *F. proliferatum* as espécies que possuem o maior número de isolados produtores de altos níveis de fumonisinas (Leslie et al., 2005; Leslie e Logrieco, 2014). De acordo com a literatura as fumonisinas podem ser produzidas em grãos de sorgo, mas geralmente em níveis mais baixos que os encontrados em milho. Isso se deve a presença comum em sorgo de outras espécies do FFSC como *F. thapsinum* e *F. andiyazi* que produzem menores quantidades de fumonisinas (Leslie e Logrieco, 2014). Por outro lado essas espécies podem oferecer riscos por produzir outras micotoxinas como a moniliformina (Leslie et al., 2005).

Além de fatores relacionados à genética dos isolados, a detecção de menores teores de fumonisinas em sorgo pode ser devido à presença de fatores inibitórios naturais nos grãos como fitoalexinas e polifenóis e das características morfológicas das sementes (dureza do grão) (Snyder e Nicholson, 1990). Dessa forma, é possível que as espécies de *Fusarium* que produziram menores teores de fumonisinas em sorgo são mais sensíveis a esses fatores.

Até o momento, não existem normas para níveis de fumonisinas em sorgo no Brasil, no entanto os níveis de fumonisinas encontrados nas amostras inoculadas com *F. proliferatum*, foram próximos ao limite máximo tolerado para milho não processado (5000 µg/kg), e acima do limite permitido para produtos a base de milho (2000 µg/kg) (Anvisa, 2011). Além disso, amostras de sorgo contaminadas com fumonisinas tem sido relatadas em outros trabalhos (Da Silva et al., 2000; Dos Reis et al., 2010). Desta forma é necessário maior atenção quanto à incidência de micotoxinas para a cultura, que é amplamente utilizada na alimentação animal e também por existir atualmente no país, incentivo ao uso do sorgo na alimentação humana, especialmente por pessoas intolerantes ao glúten (Queiroz et al., 2015). Vale ressaltar que *F. proliferatum* não é um espécie muito frequente em milho (Lanza et al., 2014) e nem em sorgo no Brasil (Dados não publicados), e que a concentração do inóculo utilizada nos experimentos podem ter favorecido a produção de altas concentrações de fumonisinas, o que pode não ser observado em condições naturais.

As maiores médias de teores de fumonisinas observados no experimento da safrinha em relação à safra, possivelmente são atribuídas à umidade relativa mais elevada a partir da data de inoculação (Figura 1), o que pode ter favorecido o melhor desenvolvimento da espécie de *Fusarium* inoculada na panícula, e conseqüentemente maior produção da micotoxina. Esses resultados corroboram com os obtidos por Dos Reis et al. (2010), que observaram que existe correlação positiva entre a umidade relativa do ar e a produção de fumonisinas. É importante destacar que historicamente são observadas maiores médias de umidade e temperatura na safra do que na safrinha. No período de condução deste experimento houve uma inversão dessa condição, sendo o período da safra mais seco que o da safrinha.

Safrinha



Safra

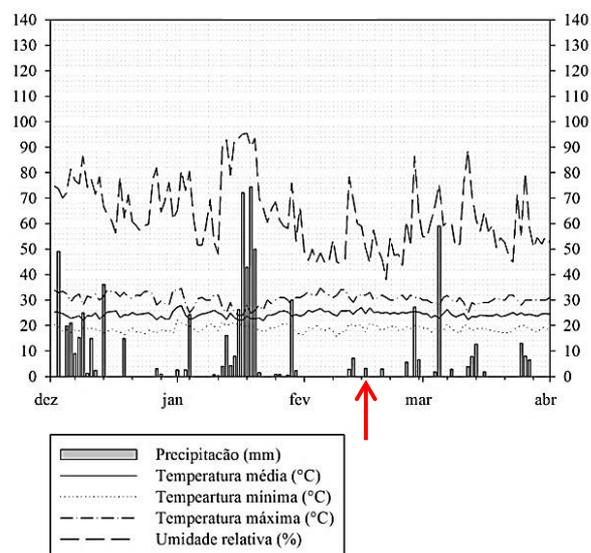


Figura 1 Condições climáticas durante o período de condução dos experimentos na safrinha (janeiro a maio de 2015) e na safra (dezembro de 2015 a abril de 2016). As setas vermelhas indicam a data de inoculação dos experimentos

3.3 Produtividade e Germinação de sementes

Na análise de produtividade, para ambos experimentos somente os fatores época de plantio e espécie inoculada+testemunha, apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$). O fator cultivar ou a interação entre os fatores analisados, não apresentaram diferença ($P > 0,05$). Foi observada maior produtividade no experimento plantado na safrinha em relação ao experimento plantado na safra (Tabela 4).

Tabela 4 Média de produção (kg/ha) nos experimentos plantados na safrinha e safra.

Experimento	Produtividade kg/ha*
Safra	1508,43 A
Safrinha	1765,73 B

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) para o fator espécie inoculada+testemunha somente entre as plantas inoculadas e as não inoculadas em ambos experimentos. Maiores médias de produtividade foram observadas para os cultivares não inoculados (Tabela 5). Portanto, não houve diferença significativa de produtividade entre os cultivares inoculados, independentemente da espécie de *Fusarium* utilizada.

De acordo com análise estatística dos dados de germinação de sementes, os fatores espécie inoculada+testemunha e cultivar apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$). As plantas inoculadas com *F. verticillioides* tiveram a maior porcentagem de sementes mortas em relação à testemunha e as demais espécies (Tabela 5), e os menores valores foram observados para a testemunha. *Fusarium fujikuroi* species complex

Tabela 5 Média de produtividade e de percentagem de sementes mortas dos três cultivares de sorgo inoculados com *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* e da testemunha não inoculada.

Espécie	Produtividade kg/ha*	% de sementes mortas*
<i>F. proliferatum</i>	1528,79 A	38,33 AB
<i>F. thapsinum</i>	1535,07 A	39,77 AB
<i>F. andiyazi</i>	1551,77 A	35,22 AB
<i>F. verticillioides</i>	1589,19 A	45,33 B
Testemunha	1980,57 B	28,22 A

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

Tabela 6 Média da percentagem de sementes mortas nos cultivares AG 50A70, BR S310 e BR S308.

Cultivar	% de sementes mortas*
BRS310	32,26 A
BRS308	32,60 A
AG50A70	47,26 B

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

Foi possível observar no presente experimento, que as parcelas inoculadas com as espécies de *Fusarium* tiveram menor produtividade quando comparado as parcelas não inoculadas (testemunha). Provavelmente o processo de colonização dos grãos pelas espécies de *Fusarium* interferiu no desenvolvimento dos mesmos. A infecção no grão enfraquece a matriz proteica e hidrolisa parcialmente o amido, interferindo no enchimento do grão que leva ao desenvolvimento de grãos menores e redução da produção e dormência de sementes (Frederiksen e Odvody, 2000; Kange et al., 2015). Perdas de produção devido à infecção por fungos tem sido observadas em outras partes do mundo (Williams e Rao, 1981; Prom, 2004). A maior produtividade no experimento da safrinha em relação a safra, pode ser relacionada a precipitação, que foi maior e melhor distribuída durante o ciclo da cultura na safrinha (Figura 1).

A redução significativa da taxa de germinação de sementes das plantas inoculadas com a espécie *Fusarium verticillioides*, indica que essa espécie tem a habilidade de infectar e matar as sementes sem produzir sintomas visíveis nos grãos. A redução de germinação por espécies do FFSC também tem sido descrita em outros trabalhos (Castor, 1981; Garud et al., 2000; Prom et al., 2003; Prom, 2004). Segundo Castor (1977), espécies de *Fusarium* podem matar indiretamente o embrião das sementes, pois interferem na translocação de nutrientes do endosperma para o embrião durante a germinação.

3.4 Análise de correlação

Segundo a análise de correlação de Pearson as variáveis analisadas não mostraram correlação significativa.

4 CONCLUSÃO

Com as informações obtidas nesse estudo conclui-se que as espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, e *F. verticillioides* associadas a sorgo no Brasil, podem produzir fumonisinas em sorgo, especialmente sob condições de umidade relativa elevada, sendo *F. proliferatum* a espécie que produz os maiores teores dessas micotoxinas. Além disso, essas espécies podem afetar a produção de sorgo, pois todas reduziram a produção e *F. verticillioides* reduziu a taxa de germinação das sementes dos cultivares de sorgo testados. Desta forma fica evidente o risco de contaminação com fumonisinas e a necessidade de mais estudos direcionados ao controle dessas espécies em sorgo e outras gramíneas cultivadas no país.

REFERÊNCIAS

ANVISA (2011) 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

Bodoci KS, Bagi FF, Berenji JJ, Stojsin VB, Budakov DB, Nad LT (2013) Level of seed infection of cultivated sorghum with fungi from genus *Fusarium*. J. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad 124: 85-90

Borém A, Pimentel L, Parrella R (2014) Sorgo do plantio a colheita. Viçosa, MG: Ed. UFV, 275p.

BRASIL (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 399p.

Castor LL (1977) Seed molding of grain sorghum. Development of high yielding disease and insect resistant sorghum cultivars. Third Annual Progress Report. Texas Agricultural Experiments Station, College Station, Texas, USA

Castor LL (1981) Grain mold histopathology, damage assessment and resistance screening within *Sorghum bicolor* (L.) Moench lines. Ph.D. thesis, Texas A & M University, College Station, TX, USA. 192 p.

Chala A, Taye W, Ayalew A.; Krska R, Sulyok M, Logrieco A (2014) Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger millet (*Eleusine coracana* L. Gärten) from Ethiopia. Food Control 45: 29-35.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento (2015). Perspectivas para a Agropecuária. Volume 3 - Safra 2015/2016. Brasília, set. 2015, 130p.

Da Silva JB, Dilkin P, Fonseca H, Corrêa B (2004) Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. Brazilian Journal of Microbiology 35:182-186.

Da Silva JB, Pozzi C R, Mallozzi MAB, Ortega EM, Corrêa B (2000) Mycoflora and occurrence of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ during storage of Brazilian sorghum. J. Agric. Food Chemistry 48:4352-4356

Dos Reis TA, Zorzete P, Pozzi CR, da Silva VN, Ortega E, Corrêa B (2010) Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal Science Food Agriculture* 90:1445-1451

EMBRAPA (2011). *Cultivo do Sorgo. Sistemas de Produção*. 7. ed. 2011. Available in: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo7_ed/index.htm

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039-1042

Frederiksen RA, Odvody GN (2000) *Compendium of Sorghum Diseases*. 2nd ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 78p.

Fumero MV, Sulyok M, Chulze S (2016) Ecophysiology of *Fusarium temperatum* isolated from maize in Argentina. *Food Additives e Contaminants* 33:147-156.

Garud TB, Ismail S, Shinde BM (2000) Effect of two mold-causing fungi on germination of sorghum seed. *International Sorghum and Millets Newsletter*: 41-54.

González HHI, Martinez, EJ, Resnik SL (1997) Fungi associated with sorghum grain from Argentina. *Mycopathologia* 139:35-41

Govardhan C, Das IK (2015) Minimization of floret infection by fungi causing grain mold in sorghum (*Sorghum bicolor*) through use of fungicides. *Indian Phytopathology* 68: 67-72

Kange AM, Cheruiyot EK, Ogendo JO, Arama PF (2015) Effect of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain conditions on occurrence of mycotoxin-producing fungi. *Agriculture & Food Security* 4:1-15.

Lahouar A, Crespo-Sempere A, Marín S, Said S, Sanchis V (2015) Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum form human consumption. *Journal of Stored Products Research* 63:57-62.

Lanza FE, Zambolim L, Costa RV, Queiroz VAV, Cota LV, Silva DD, Souza AGC, Figueiredo JEF (2014) Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. *Crop Protection* 65:232-237.

Leslie JF, Logrieco A (2014) *Micotoxins reduction in grains chains*. Wiley-Blackwell, USA, 376 p

Leslie JF, Zeller KA, Lamprecht SC, Rheeder JP, Marasas WFO (2005) Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283.

Petrovic T, Burgess LW, Cowie I, Warren RA, Harvey PR (2013) Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in Northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize. *European Journal Plant Pathology* 136:773-788.

Prom LK (2004) The effects of *Fusarium thapsinum*, *Curvularia lunata*, and their combination on sorghum germination and seed mycoflora. *Journal New Seed* 6:39-49.

Prom LK, Waniska RD, Kollo AI, Rooney WL (2003) Response of eight sorghum cultivars inoculated with *Fusarium thapsinum*, *Curvularia lunata*, and a mixture of the two fungi. *Crop Protection* 22:623-628.

Queiroz, VAV, Menezes, CB, Barros FAR, Martino HSS. O sorgo na alimentação humana. In: Pereira FIA, Rodrigues, JAS. (Ed.). *Sorgo: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa, 2015, Cap. 15: 247-266

Snyder BA, Nicholson RL (1990) Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science* 248:1633-1639.

Sharma R, Thakur RP, Senthilvel S, Nayak S, Reddy V, Rao VP, Varshney RK (2011) Identification and Characterization of Toxicogenic Fusaria Associated with sorghum grain mold complex in India. *Mycopathologia* 171:223-230.

Williams RJ, Rao KN (1981) A review of sorghum grain molds. *Tropical Pest Management* 27:200-211.

CAPÍTULO 4 Definição de *Fusarium andiyazi* como mating population

Neste capítulo são apresentados resultados de *F. andiyazi* que não foram incluídos nos capítulos 2 e 3 e que serão utilizados em outra publicação.

1 INTRODUÇÃO

Fusarium andiyazi é uma espécie pertencente ao FFSC que foi descrita mais recentemente em sorgo por Marasas et al. (2001). Desde sua descoberta, alguns trabalhos tem revelado a presença dessa espécie em sorgo e outras gramíneas cultivadas em diferentes regiões do mundo. Até o momento, ainda não se conhecia o estágio sexual de *F. andiyazi*. Leslie et al. (2005), realizaram cruzamentos em laboratório com o objetivo de induzir a fase sexual desta espécie, no entanto, não observaram peritécios férteis entre os cruzamentos analisados. Em uma coleção de 26 isolados de *F. andiyazi* obtidos de sorgo no Brasil, foram observados os dois *mating types* nos isolados analisados. Desta forma, objetivou-se induzir a fase sexual de *F. andiyazi* provenientes de sorgo no Brasil e relatar esta espécie como uma nova *mating population* dentro do FFSC.

Obtenção de cruzamentos férteis entre isolados de *F. andiyazi* e descrição do estágio sexual

Isolados de *F. andiyazi* de *mating types* opostos foram cruzados entre si, em todas as combinações possíveis para a obtenção da fase sexual dessa espécie, conforme metodologia descrita no item 2.3 do capítulo 2.

Dos 30 isolados de *F. andiyazi* 19 foram identificados como idiomorfo *MAT-1* e 10 como idiomorfo *MAT-2* (Tabela 1 do capítulo 2). Foram realizados aproximadamente 410 cruzamentos. As condições de incubação dos cruzamentos, como temperatura de 22-23°C e luz branca fluorescente constante, foram eficientes na formação de peritécios férteis entre isolados de *F. andiyazi*. Peritécios foram observados entre a primeira e a quarta semana de avaliação, sendo a exsudação observada uma semana após o surgimento dos peritécios. Em 8 cruzamentos distintos foi observada a formação de peritécios férteis. O resultado se confirmou nas duas repetições (Tabela 1).

Tabela 1 Relação dos cruzamentos entre isolados de *F. andiyazi* avaliados após incubação a 22-23°C e luz constante.

♀ (<i>MAT-1</i>) ^a		♂ (<i>MAT-2</i>) ^b	♀ (<i>MAT-2</i>) ^c		♂ (<i>MAT-1</i>) ^d
CML2780	X	CML2813	CML2793	X	CML2758
CML2780	X	CML2754*	CML2793	X	CML2762
CML2780	X	CML2812*	CML2793	X	CML2763
CML2756	X	CML884	CML2793	X	CML2780
CML2756	X	CML2754*	CML2768	X	CML2807
CML2756	X	CML2768*	CML2768	X	CML2783*
CML2756	X	CML2802*	CML2768	X	CML2796*
CML2756	X	CML2812*	CML2768	X	CML2807*
CML2756	X	CML2813*	CML2821	X	CML2783*
CML2756	X	CML2821*			
CML2801	X	CML2821			
CML2740	X	CML2754*			
CML2740	X	CML2768*			
CML2740	X	CML2802*			
CML2740	X	CML2812*			
CML2740	X	CML2813*			
CML2740	X	CML2821*			
CML2740	X	CML884*			
CML2746	X	CML2754*			
CML2746	X	CML2812*			
CML2746	X	CML2813*			
CML2746	X	CML884*			
CML2758	X	CML2802*			
CML2758	X	CML2812*			
CML2758	X	CML2813*			
CML2758	X	CML2821*			
CML2758	X	CML884*			
CML2762	X	CML2821*			
CML2763	X	CML884*			
CML2817	X	CML884*			

^a ♀ (*MAT-1*) indica os isolados do *mating type* *MAT-1* férteis como fêmea

^b ♂ (*MAT-2*) indica os isolados do *mating type* *MAT-2* férteis como macho

^c ♀ (*MAT-2*) indica os isolados do *mating type* *MAT-2* férteis como fêmea

^d ♂ (*MAT-1*) indica os isolados do *mating type* *MAT-1* férteis como macho

* Cruzamentos que produziram peritécios, porém, não ocorreu exudação de ascósporos

Cruzamentos férteis foram observados entre um isolado de sorgo (CML 2780) e um isolado de milho (CML 2813) e entre um isolado de sorgo do Brasil (CML 2756) com um isolado de sorgo da Etiópia (CML 884) (Tabela 1). Os isolados CML 2780 e CML 2793 formaram peritécios férteis com mais de um parceiro sexual (Tabela 1), e poderão ser utilizados como testadores, já que apresentaram maior fertilidade. Trinta e um cruzamentos formaram peritécios, entretanto, não ocorreu à exsudação de ascósporos nas duas repetições (Tabela 1).

É importante ressaltar que foram obtidos cruzamentos férteis entre isolados pertencentes ao grupo 1, entre isolados pertencentes ao grupo 2 e entre isolados do grupo 1 com o grupo 2.

Os ascósporos exsudados pelos peritécios de todos os cruzamentos férteis de todas as espécies avaliadas mostraram-se viáveis, germinando após 12 horas de incubação.

As estruturas da fase sexuada foram caracterizadas, realizando a medição do diâmetro dos peritécios, comprimento e largura dos ascos e ascósporos e verificação do número de septos. Foram realizadas 10 medições de peritécios e ascos e 30 medições de ascósporos, as quais serviram para a comparação com as espécies do FFSC, já descritas na literatura.

O teleomorfo de *F. andiyazi*, apresentou características morfológicas típicas de outras espécies do FFSC, como peritécios negros, arredondados a ovais, medindo 200-425 x 190-400 μm , geralmente únicos, mas ocasionalmente agrupados. Ascos fusiformes, contendo geralmente 8 ascósporos, medindo 62,5-100 x 6,25-12,5 μm . Ascósporos exsudados em cirrus, hialinos, elipsóides a ovóides com ambas células finais arredondadas, contendo de 1 a 3 septos, geralmente um com a presença de uma leve constrição e medindo 11,5-20 x 4-7,5 μm (Figura 1).

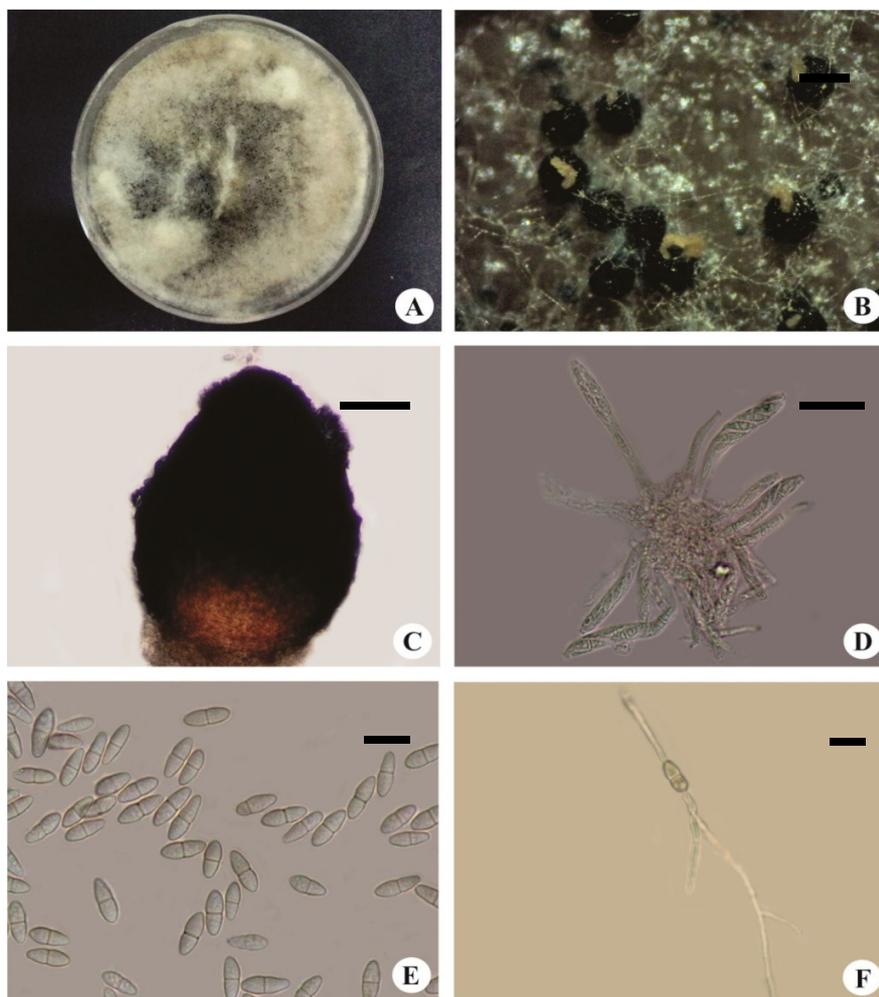


Figura 1 Características morfológicas do teleomorfo de *F. andiyazi*. A. Placa contendo peritécios férteis no cruzamento dos isolados CML 2793 e CML 2780; B. Peritécios exsudando ascósporos. Barra = 300 μm ; C. Peritécio. Barra = 100 μm ; D. Ascósporos. Barra = 20 μm ; E. Ascósporos. Barra = 10 μm ; F. Ascósporo germinando. Barra = 10 μm

ANEXO A

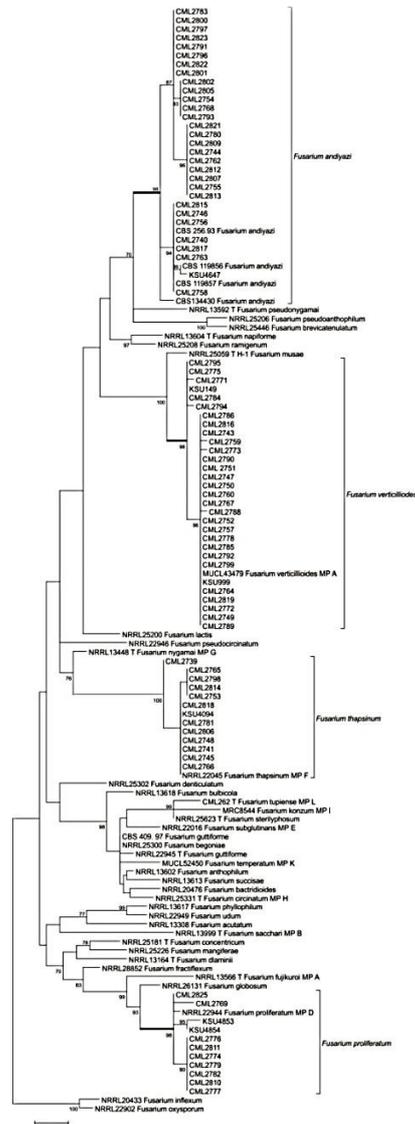


Figura 1A Uma das árvores mais parcimoniosas inferidas a partir de sequências do gene *ref-1a* geradas por todos os isolados de *Fusarium* obtidos nesse estudo e isolados de referência pertencentes ao *Gibberella fujikuroi* species complex. O Comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios.

ANEXO B

Tabela 1B Relação dos cruzamentos entre isolados testadores das espécies *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides* e isolados destas espécies provenientes de sorgo e milho no Brasil.

Espécie	♀ (MAT-1) ^a	♂ (MAT-2) ^b	♀ (MAT-2) ^c	♂ (MAT-1) ^d
<i>F. proliferatum</i>	CML 771	x	CML 2774	
	CML 771	x	CML 2776	
	CML 771	x	CML 2777	
	CML 771	x	CML 2779	
	CML 771	x	CML 2825	
	CML 771	x	CML 2782*	
	CML 771	x	CML 2810*	
	CML 771	x	CML 2811*	
	CML 771	x	CML 2769*	
<i>F. thapsinum</i>	CML 775	x	CML 2739	CML 774
	CML 775	x	CML 2781	CML 774
	CML 775	x	CML 2745*	CML 774
	CML 775	x	CML 2798*	CML 774
	CML 775	x	CML 2766*	
	CML 775	x	CML2814*	
	CML 775	x	CML2818*	
	CML 775	x	CML 2748*	
<i>F. verticillioides</i>	CML 766	x	CML 2743	CML 767
	CML 766	x	CML2751	CML 767
	CML 766	x	CML2752	CML 767
	CML 766	x	CML2759	CML 767
	CML 766	x	CML 2773	CML 767
	CML 766	x	CML 2778	CML 767
	CML 766	x	CML 2785	CML 767
	CML 766	x	CML 2789	
	CML 766	x	CML 2790	
	CML 766	x	CML 2794	
	CML 766	x	CML 2749	
	CML 766	x	CML 2750	
	CML 766	x	CML 2760	
	CML 766	x	CML 2767	
	CML 766	x	CML 2786	
	CML 766	x	CML 2788	
	CML 766	x	CML 2795	
	CML 766	x	CML 2772*	
	CML 766	x	CML 2799*	
	CML 766	x	CML 2764*	
	CML 766	x	CML 2771*	

^a ♀ (MAT-1) indica os isolados do mating type MAT-1 férteis como fêmea

^b ♂ (MAT-2) indica os isolados do mating type MAT-2 férteis como macho

^c ♀ (MAT-2) indica os isolados do mating type MAT-2 férteis como fêmea

^d ♂ (MAT-1) indica os isolados do mating type MAT-1 férteis como macho

* Cruzamentos que produziram peritécios, porém, não ocorreu exsudação de ascósporos.