



MARILEIDE MOREIRA COSTA

**ESPÉCIES DE *FUSARIUM* ASSOCIADAS A
POKKAH BOENG DA CANA-DE-AÇÚCAR NO
BRASIL**

LAVRAS – MG

2016

MARILEIDE MOREIRA COSTA

**ESPÉCIES DE *FUSARIUM* ASSOCIADAS A *POKKAH BOENG* DA
CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

**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).**

Costa, Marileide Moreira.

Espécies de *Fusarium* associadas a *Pokkah boeng* da cana-de-açúcar no
Brasil/ Marileide Moreira Costa. – Lavras : UFLA, 2016.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras,
2016.

Orientador(a): Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. *Fusarium fujikuroi* species complex. 2. *Saccharum officinarum*. 3.
Filogenia molecular. 4. Micotoxinas. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

MARILEIDE MOREIRA COSTA

**ESPÉCIES DE *FUSARIUM* ASSOCIADAS A *POKKAH BOENG* DA
CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 24 de agosto de 2016.

Dr. Jorge Teodoro de Souza UFLA

Dra. Patrícia Gomes Cardoso UFLA

Dra. Sarah da Silva Costa UFLA

Orientador

Dr. Ludwig H. Pfenning

LAVRAS - MG

2016

Aos meus pais, Luiz Henrique Pereira da Costa e Marina Moreira da Costa

*Aos meus irmãos Lucimário Moreira da Costa, Mariluce Moreira Costa,
Claudiane Moreira Costa e Leandro Moreira da Costa*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar nas minhas escolhas e momentos de dúvidas e incertezas.

À Universidade Federal de Lavras e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. Aos professores pelos valiosos ensinamentos durante o Mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Ludwig H. Pfenning, pela orientação, confiança e ensinamentos.

Aos professores Dra. Patrícia Gomes Cardoso e Dr. Jorge Teodoro de Souza, que se dispuseram a participar da banca examinadora e pela grande contribuição.

Aos colegas Dr. Maruzanete P. de Melo, Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães, Dr. Gláucia Mara Moreira e Dr. Elaine Aparecida Guimarães pela valiosa contribuição neste trabalho.

Aos amigos da UFLA, do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos pelo companheirismo e boa convivência.

À minha mãe, pelo incentivo e apoio incondicional. Aos meus irmãos e sobrinho queridos, pelo amor, companheirismo e alegria.

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

RESUMO GERAL

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), tendo a cultura grande expressão econômica e social. Entre as doenças fúngicas, que podem trazer prejuízos no setor canavieiro tem-se a *Pokkah boeng*, causada por espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Os sintomas são a deformação na parte aérea e podridão do colmo. Apesar dos sintomas da *Pokkah boeng* serem eventualmente observados em plantações de cana no Brasil, existem apenas registros não oficiais da doença. Os objetivos do presente trabalho foram (i.) averiguar a diversidade de espécies do FFSC associadas a *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar no Brasil, usando filogenia molecular, cruzamentos em laboratório e avaliação da morfologia (ii.) testar a patogenicidade em plantas de cana-de-açúcar, sorgo, milho e milheto e (iii.) avaliar o potencial da espécie *F. sacchari* em produzir fumonisinas B₁, B₂ e moniliformina *in vitro*. Por meio de análise filogenética dos genes *fator de alongação 1-α* e segunda maior subunidade da RNA polimerase II, compatibilidade sexual e caracterização morfológica, os 39 isolados obtidos de plantas com sintomas de *Pokkah boeng* foram identificados como *F. sacchari*, *F. proliferatum* e uma nova linhagem filogenética *Fusarium* sp. Cruzamentos de isolados obtidos do campo com os respectivos testadores resultaram na formação de peritécios férteis das espécies *F. sacchari* e *F. proliferatum*, confirmando a identidade das espécies. Nos cruzamentos entre os 10 isolados de *Fusarium* sp. houve produção de peritécios férteis, indicando a ocorrência de nova espécie biológica no FFSC. Isolados de *Fusarium* sp., quando cruzados com testadores das outras espécies do FFSC, a formação de peritécios não foi observada, evidenciando a presença de barreira reprodutiva. As três espécies identificadas induziram sintomas de *Pokkah boeng* quando inoculadas em plantas de cana-de-açúcar e causaram podridão de colmo em plantas de milho, sorgo e milheto. É reforçada a hipótese que não existe especificidade em relação ao hospedeiro, apenas afinidade. Entre os isolados de *F. sacchari* avaliados foi observada a produção de traços de moniliformina e alta concentração de fumonisina B₁. A linhagem *Fusarium* sp. será formalmente descrita e elevada ao nível de espécie, pois representa uma nova espécie filogenética e biológica no FFSC. Os resultados obtidos esclarecem a etiologia da *Pokkah boeng* no Brasil e subsidiam programas de seleção e de melhoramento de germoplasma vegetal visando resistência à doença, além de gerar a base de conhecimento necessário para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para o monitoramento e diagnose da doença.

Palavras-chave: *Fusarium fujikuroi* species complex. *Saccharum officinarum*. Filogenia molecular. Micotoxinas.

ABSTRACT

Brazil is the world's biggest producer of sugar cane (*Saccharum officinarum*). Among the diseases caused by fungi is cited pokkah-boeng, caused by species belonging to the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC). The most typical symptoms of the disease are a morphological deformation of the aerial part of the plant and stem rot. While the occurrence of symptoms is eventually reported in plantations in Brazil, no official reports of the disease exist. In this study we investigated (i.) what species of the FFSC occur in association with sugar-cane plants with symptoms of pokkah-boeng in Brazil, using a two gene molecular phylogeny, sexual compatibility and analysis of morphological markers; (ii.) if the species cause disease in plants of sugar-cane, maize, sorghum and millet; (iii.) the potential of *Fusarium sacchari* in producing the toxins fumonisin B₁, B₂ and moniliformin *in vitro*. According to the phylogenetic analysis of the gene regions elongation factor *1- α* and RPB2, sexual compatibility and morphological markers, the 39 isolates studied were identified as *F. sacchari*, *F. proliferatum* and another still unknown phylogenetic lineage, sister of *Fusarium andiyazi*. Crossing isolates of *F. sacchari* and *F. proliferatum* from the field with available tester strains produced fertile perithecia and viable ascospores. Crossings between 10 isolates of the unknown lineage also produced fertile perithecia and viable ascospores. When crossed with tester strains of other known mating populations of the FFSC, no perithecia were observed, giving evidence that this new lineage represents also a new biological species within the FFSC. All three species induced symptoms of pokkah-boeng when inoculated in sugar-cane plants and caused stem rot in maize, sorghum and millet. Probably, there is no specificity of those species with regard to host plants, only affinity. Among isolates of *F. sacchari* the production of elevated levels of fumonisin B₁ and traces of moniliformin was observed. The findings confirm the etiology of pokkah-boeng in Brazil and will give support to breeding programs aiming the selection of resistant germplasm. The results also generated basic knowledge for the development of strategies for diagnosis and monitoring of the disease. The new species will be described, based on the application of the phylogenetic and biological species concept.

Key Words: *Fusarium fujikuroi* species complex. *Saccharum officinarum*. Molecular Phylogeny. Mycotoxins.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	15
1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	155
2	ESTADO DA ARTE	177
2.1	Espécies do complexo <i>Fusarium fujikuroi</i> (FFSC) como patógenos de plantas..	177
2.2	Espécies do FFSC como patógenos da cana-de-açúcar	199
2.3	Espécies do FFSC como produtores de micotoxinas	221
	REFERÊNCIAS.....	23
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	277
	ESPÉCIES DE <i>Fusarium</i> ASSOCIADAS A <i>POKKAH BOENG</i> DA CANA-DE- AÇÚCAR NO BRASIL.....	Erro! Indicador não definido.7
	RESUMO	288
	ABSTRACT	289
1	INTRODUÇÃO.....	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	332
2.1	Obtenção de isolados e preservação.....	332
2.2	Caracterização morfológica.....	36
2.3	Extração de DNA, PCR e análises filogenéticas	36
2.4	Teste de homotalismo, identificação de <i>mating type</i> e indução da fase sexuada	40
2.5	Perfil de micotoxinas dos isolados	42
2.6	Teste de patogenicidade	44
2.7	Avaliação da patogenicidade em sorgo, milho e milheto.....	45
3	RESULTADOS	47
3.1	Análise filogenética	47
3.2	Determinação de <i>mating types</i> e teste de compatibilidade sexual.....	59
3.3	Caracterização morfológica.....	59
3.4	Perfil de micotoxinas dos isolados	52
3.5	Teste de patogenicidade	53
3.6	Avaliação da patogenicidade em sorgo, milho e milheto.....	54
4	DISCUSSÃO	57
	PERSPECTIVAS	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	MATERIAL COMPLEMENTAR.....	67

PRIMEIRA PARTE

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Essa cultura tem uma grande expressão tanto do ponto de vista econômico quanto social, pois é utilizada para produzir açúcar, álcool, aguardente, forragem e vários subprodutos, além da geração de empregos diretos e indiretos. Dentre as doenças que afetam a cana-de-açúcar, a *Pokkah boeng*, conhecida principalmente na Ásia, tem provocado danos expressivos na cultura. As plantas com sintomas apresentam deformação no topo e podridão do colmo (Siti Nordahliawate et al., 2008).

Diversas espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi* species complex - FFSC), como *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*, já foram reportadas em associação a essa doença em países como Indonésia e Malásia. No entanto, grande parte da literatura internacional menciona que o agente etiológico de *Pokkah boeng* é *Fusarium sacchari* (Leslie & Summerell, 2006; Siddique 2007; Siti Nordahliawate et al., 2008; Lin et al., 2014).

Sintomas da doença podem ser eventualmente observados em plantações de cana no Brasil, através da deformação e podridão da parte aérea das plantas, no entanto, apesar de o Brasil ser um dos maiores produtores de cana, não há relatos na literatura da confirmação da etiologia da *Pokkah boeng*.

Embora seu nome seja sugestivo para um hospedeiro específico, a espécie *F. sacchari* já foi encontrada em plantas cultivadas como milho, arroz e sorgo, onde causa podridão em raízes, além de ocorrer como endófito em gramíneas selvagens (Hsuan et al., 2011; Sharma et al., 2011).

Diversas espécies do FFSC têm sido relatadas como produtoras das micotoxinas beauvericina, ácido fusárico, moniliformina e fumonisina (Leslie et

al., 1992; Bacon et al., 1996; Moretti et al., 1996), sendo fumonisinas e moniliformina as mais prejudiciais à saúde humana e animal (Leslie et al., 2005).

Em virtude da escassez de literatura científica primária sobre a identidade e características biológicas dos agentes etiológicos da *Pokkah boeng* no Brasil, este trabalho se propõe a responder às seguintes questões: (i.) Seria *F. sacchari* o agente etiológico da *Pokkah boeng* no Brasil? (ii.) Existem outras espécies de *Fusarium* que induzem sintomas de *Pokkah boeng*? (iii.) Isolados que induzem sintomas de *Pokkah boeng* podem causar sintomas em outras plantas?

Os objetivos do presente trabalho foram averiguar a diversidade de espécies do FFSC associadas à *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar de diferentes regiões do Brasil, usando filogenia molecular multilocus e teste de compatibilidade sexual, testar a patogenicidade em plantas de cana-de-açúcar, especificidade nas culturas do sorgo, milho e milheto e a capacidade de produção de micotoxinas das espécies encontradas.

Esta dissertação está dividida em duas partes. A primeira diz respeito ao estado da arte, no qual são descritas espécies do FFSC como patógenos de plantas, patógenos da cana-de-açúcar e produtores de micotoxinas. A segunda parte se refere ao estudo da diversidade de espécies associadas à doença *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar no Brasil, capacidade dessas espécies em induzirem podridão nas culturas de milho, sorgo e milheto e de produzirem micotoxinas.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) como patógenos de plantas

O complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*, que correspondia principalmente à seção *Liseola*, mas também acomodava espécies originalmente classificadas em outras seções de *Fusarium*, hoje representa aproximadamente 50 espécies filogenéticas e 13 espécies biológicas (Nirenberg & O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 1998, 2000; Geiser et al., 2005, 2013). A seção *Liseola* foi estabelecida para agrupar espécies caracterizadas pela produção de macroconídios em esporodóquios ou pionotos, microconídios em falsas cabeças e/ou cadeias e que não produzem clamidósporos (Leslie & Summerell, 2006).

A associação de espécies do FFSC em alguns patossistemas já está bem estabelecida, o que inclui vários patógenos de plantas economicamente importantes. Em arroz, o estiolamento (*bakanae*) induzido pelo fitormônio giberelina está relacionado com a presença da espécie *F. fujikuroi* (Mohd Zainudin et al., 2011).

Em fruteiras, como o abacaxizeiro e a mangueira, a incidência de fusariose pode resultar em perdas elevadas na produção e, em alguns casos, inviabilizar completamente a atividade produtiva. No abacaxizeiro, a doença conhecida como gomose tem no Brasil como agente etiológico *F. guttiforme* (Nirenberg & O'Donnell, 1998). Na África do Sul, estudos baseados em filogenia molecular, utilizando sequenciamento das regiões gênicas fator de alongação 1- α , Histona H3 e β -tubulina, mostraram que o agente causal da podridão do fruto do abacaxi representava uma nova espécie pertencente ao FFSC, descrita como *F. ananatum* (Jacobs et al., 2010).

Na mangueira, as espécies *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* estão associadas com o crescimento anormal de inflorescências e ramos vegetativos (Britz et al., 2002). No Brasil foi verificado que *F. tuiense* é o principal agente da malformação da mangueira, descrito através de estudos filogenéticos, análises de padrões de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), avaliação da morfologia e testes de patogenicidade (Lima et al., 2012). No México, análise filogenética multilocus demonstrou que uma nova espécie, nomeada *F. mexicanum*, está associada a malformação da mangueira (Otero et al., 2010).

Enquanto que para os patossistemas mencionados a base de conhecimento em relação à diversidade de espécies associadas e sua importância como agentes etiológicos de doenças é bem conhecida, para outros ainda é restrita. Como exemplo tem-se a cultura da cana-de-açúcar, para a qual há registros das espécies *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides* associadas aos sintomas da doença denominada *Pokkah boeng*. Porém no Brasil há deficiência de literaturas primárias sobre as espécies de *Fusarium* que são patogênicas a essa cultura.

Existem relatos da falta de especificidade de espécies do FFSC ao hospedeiro. *Fusarium circinatum*, agente causal de cancro em *Pinus*, é um dos patógenos mais importantes da cultura e tem sido relatado em vários países, inclusive no Brasil (Wingfield et al., 2008; Steenkamp et al., 2012; Pfenning et al., 2014). Em espécies de gramíneas assintomáticas próximas a árvores de *Pinus* com sintomas de cancro foram obtidos isolados de *F. circinatum*, estes mesmos isolados foram capazes de induzir cancro em mudas de pinheiros, evidenciando que outra planta fora da família Pinaceae pode ser hospedeira de *F. circinatum* (Swett & Gordon, 2012).

Fusarium sacchari, espécie associada à *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar, já foi encontrado como endófito em plantas cultivadas e gramíneas selvagens (Leslie & Summerell, 2006; Petrovic et al., 2013). Em áreas extensas

de *Oryza australienses* na Austrália, isolados da espécie *F. sacchari* foram encontrados como endófitos predominantes. Estes mesmos isolados causaram podridão de raízes em milho, arroz e sorgo (Petrovic et al., 2013). Recentemente a espécie foi identificada em sorgo na Índia (Sharma et al., 2011). *Fusarium sacchari* também foi relatado causando doenças em sorgo nas Filipinas e no México (Ploetz, 2006).

2.2 Espécies do FFSC como patógenos da cana-de-açúcar

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar se tornou uma das principais culturas do cenário da economia brasileira. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, mas também o primeiro do mundo na produção dos derivados açúcar e etanol, e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. A cana-de-açúcar é produzida em quase todo o país, sendo 51,8% em São Paulo e as demais zonas produtoras são Goiás, Minas Gerais (Triângulo Mineiro e Zona da Mata), Mato Grosso do Sul e Paraná (Conab, 2015).

Entretanto, relevantes perdas na cultura são causadas por várias doenças. Entre as doenças fúngicas que podem trazer prejuízos no setor canavieiro tem-se a *Pokkah boeng* que causa deformação na parte aérea, podridão do colmo e murcha (Bourne, 1922; Abbott, 1932; Egan et al., 1997; Nirenberg & O'Donnell, 1998; Viswanathan et al., 2011). Os sintomas se evidenciam com descoloração e enrugamento das folhas próximo à região apical, evoluindo para a podridão no topo da planta com posterior quebra de dominância apical e emissão de brotações laterais. O colmo apresenta lesões denominadas “corte de faca” exibindo em seu interior coloração avermelhada com crescimento do patógeno. A disseminação ocorre principalmente via material propagativo. Este fungo tem a capacidade de sobreviver em tecidos meristemáticos por longos

períodos e ser disseminado via colmos infectados (Siti Nordahliawate et al., 2008).

Diversas espécies do FFSC são associadas à *Pokkah boeng* (Leslie & Summerell, 2006; Siddique 2007; Siti Nordahliawate et al., 2008; Lin et al., 2014). Na Ásia foi confirmada a associação de *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* com plantas que apresentavam sintomas dessa doença (Hsuan et al., 2011).

Coletas de amostras de plantas de cana-de-açúcar sintomáticas realizadas em regiões produtoras no Brasil e relatos de técnicos que trabalham com a cultura confirmam a presença da doença *Pokkah boeng* nos canaviais brasileiros. Entretanto, apesar de o Brasil ser o maior produtor de cana-de-açúcar, até o momento não há relato de quais espécies estão associadas a esta cultura. Ainda são observados os nomes obsoletos “*F. moniliforme* var. *subglutinans*” ou “*F. moniliforme*”, sendo empregados para o agente causador de *Pokkah boeng* ou podridão de colmo. Este fato pode ser explicado pela identificação de fungos apenas com base em caracteres morfológicos e não pela utilização de estudos moleculares. Espécies como *F. sacchari* compartilham marcadores morfológicos com outras espécies do FFSC, como *F. subglutinans*, *F. circinatum*, *F. mangiferae* e *F. temperatum*, não podendo distingui-los morfológicamente (Kvas et al., 2009; Scaufaire et al., 2012), tendo como principais características a formação de conídios clavados em cadeias no micélio aéreo e a ausência de clamidósporos (Leslie & Summerell, 2006).

Grande parte da literatura menciona que o agente etiológico é *F. sacchari* causando perdas na produção da cana-de-açúcar em outros países (Egan et al. 1997; Nirenberg & O'Donnell, 1998; Siddique, 2007; Viswanathan et al., 2011). Este fungo tem a capacidade de sobreviver em tecidos meristemáticos por longos períodos e ser disseminado via colmos infectados (O'Donnell et al., 1998; Leslie & Summerell, 2006). Portanto, é possível que *F.*

sacchari e outros membros do FFSC estejam presentes em vários plantios de cana-de-açúcar no Brasil.

2.3 Espécies do FFSC como produtores de micotoxinas

Muitas espécies de *Fusarium* produzem vários metabólitos secundários, tais como as micotoxinas fumonisinas e moniliformina (Leslie et al., 2005). Estas têm efeitos deletérios na saúde humana e animal, com efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos (Leslie, 1995; Nirenberg & O'Donnell, 1998; Desjardins, 2006).

Dentre as espécies do FFSC que são produtoras de micotoxinas tem-se *F. thapsinum*, que produz ácido fusárico, moniliformina, fumonisina, *F. verticillioides* (fumonisinas, ácido fusárico, fusarinas, tricotecenos), *F. nygamai* (fumonisinas, beauvericina, ácido fusárico, moniliformina), *F. proliferatum* (moniliformina), *F. andiyazi* (fumonisina) e *F. sacchari* (beauvericina, ácido fusárico, moniliformina) (Desjardins, 2006).

Durante toda a cadeia produtiva, processamento, transporte e armazenamento, os alimentos estão sujeitos à invasão por fungos micotoxigênicos. A produção e aumento dessas micotoxinas no alimento são influenciados principalmente por fatores ambientais, como umidade, temperatura, atmosfera de armazenamento, pH e agentes competidores (Lacey & Magan, 1991).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana direta ou indiretamente. Diretamente, através do consumo de cereais, oleaginosas e derivados. Derivados como leite, carne e ovos podem apresentar micotoxinas quando os animais consomem alimentos contaminados, constituindo em fonte de contaminação indireta para os humanos (Molin & Valentini, 1999).

Existem diferentes séries de fumonisinas estruturalmente relacionadas: A (A₁ - A₄), B (B₁ -B₄), C (C₁ -C₄) e P¹⁰. No entanto, a que se encontra em maior abundância, sendo também considerada 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, portanto, persistindo no produto final, como a ração animal. As fumonisinas podem ser encontradas principalmente em milho e seus derivados, arroz, sorgo e feijão (Labuda et al., 2003).

Em 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 edemas pulmonares em suínos e câncer de esôfago em humanos, sendo este último com maior frequência na África do Sul (Harrison et al., 1990; Marasas, 1995; Leslie et al., 2005).

A moniliformina é uma micotoxina encontrada em grãos, principalmente em milho e sorgo. Essa micotoxina pode ser transferida para a próxima geração de culturas (Guzman et al., 1994). A moniliformina pode produzir efeitos fitotóxicos em plantas e também provou ser tóxica a várias espécies animais (Von Bargen et al., 2012).

Estudos *in vitro* sobre a toxicidade da moniliformina indicaram uma inibição de múltiplos sistemas enzimáticos (Von Bargen et al., 2012). Problemas de saúde humana não foram associados com a moniliformina, mas estudos da alimentação de diferentes espécies de aves, como frangos e patos, com ração contaminada com a micotoxina resultaram em sintomas como acidose, fraqueza muscular e efeitos patológicos nos tecidos do coração (Uhlir et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- Abbott EV (1932) Seed rots of sugarcane in Louisiana. In Proceedings of International Society for Sugar Cane Technologists, Congress Bulletin 48:1-2.
- Bacon CW, Porter JK., Norred WP, Leslie JF (1996) Production of fusaric acid by *Fusarium* species. Applied and Environmental Microbiology 62:4039-4043.
- Bourne BA (1922) Researches on the root diseases of sugarcane. Department of of Agriculture p.17.
- Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WFO, Wingfield MJ (2002) Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. Mycologia 94:722-730.
- Conab (2015) Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar Safra 2015/16 v.2, n.3, Brasília DF, p.1-65.
- Desjardins AE (2006) *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota U.S.A, 260 p.
- Egan BT, Magarey RC, Croft BJ (1997) Sugarcane. In Soil borne diseases of tropical crops, eds. R.J. Hillocks, and J.M.Walker. Wallingford, Oxon: CAB International. pp.277-302.
- Geiser DM, Lewis Ivey ML, Hakiza G, Juba JH, Miller SA (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.
- Guzman RE, Casteel SW (1994) Fumonisin mycotoxins: their origin and effects on livestock. The Professional Animal Scientist 10:124-129.
- Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JR (1990) Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisinB1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2:217-221.
- Hsuan HM, Salleh B, Zakaria L (2011) Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize

from peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences* 12:6722-6732.

Jacobs A, Van Wyk PS, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Coutinho TA (2010) *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. *Fungal Biology* 114:515-527.

Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34:1-21.

Labuda R, Tancinova DE, Hudec K (2003) Identification and enumeration of *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10:61-66.

Lacey J, 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 Sciencepp.118.

Leslie JF (1995) *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany* 73(Suppl. 1): 282-291.

Leslie JF, Plattner RD, Desjardins AE, Klittich CJR (1992) Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* 82:341-345

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Malden: Blackwell, USA, 420 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.

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF (2012) *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 104:1408-1419.

Lin Z, Xu S, Que S, Wang Y, Comstock JC, Wei J, McCord PH, Chen B, Chen R, Zhang M (2014) Species-Specific Detection and Identification of *Fusarium* Species Complex, the Causal Agent of Sugarcane Pokkah Boeng in China. *PLOS One*. 9:1-13.

Marasas WFO (1995) Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural Toxins*: 193-198.

Mohd Zainudin, NAI, Razak, AA, Salleh, B (2008) Bakanae disease of rice in Malaysia and Indonesia: Etiology of the causal agent based on morphological, physiological and pathogenicity characteristics. *Journal of Plant Protection Research* 48:476-485.

Molin R, Valentini ML (1999) Simpósio sobre micotoxinas em grãos. Fundação Cargil. 208 p.

Moretti A, Logrieco A, Dottalico A, Ritieni A, Fogliano V, Randazzo G (1996) Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Sydowia* 48:44-56.

Nirenberg HI, O'Donnell K. (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:434-458.

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

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

Otero-Colina G, Rodriguez-Alvarado G, Fernandez-Pavia SP, Maymon M, Ploetz RC, Aoki T, O'Donnell K, Freeman S (2010) Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology* 100:1176-1184.

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.

Pfenning LH, Costa SS, Melo MP, Costa H, Ventura JÁ, Auer CG, Santos AF (2014) First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39:210-216.

Ploetz RC (2006) *Fusarium*-induced disease of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96:648-652.

Scaufflaire J, Gourgue M, Callebaut A, Munaut F (2012) *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. *European Journal Plant Pathology* 133:911-922.

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

Siddique, S (2007) Pathogenicity and aethiology of *Fusarium* species associated with pokkah boeng disease on sugarcane. Thesis, University of Malaysia, Malaysia. Universiti Sains Malaysia.

Siti Nordahliawate MS, Nur Ain Izzati MZ, Azmi AR, Salleh B (2008) Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal Tropical Agricultural Sciences* 31:279-286.

Steenkamp ET, Rodas CA, Kvas M, Wingfield MJ (2012) *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. *Australasian Plant Pathology* 41:483-491.

Swett CL, Gordon TR (2012). First report of grass species (Poaceae) as naturally occurring hosts of the pine pathogen *Gibberella circinata*. *Plant Disease* 96:908.

Uhlig S, Jestoi M, Parikka P (2007). *Fusarium avenaceum* the north European situation. *International Journal of Food Microbiology* 119:17-24.

Viswanathan R, Poongothai MMP (2011) Pathogenic and Molecular Confirmation of *Fusarium sacchari* Causing Wilt in Sugarcane. *Sugar Tech* 13:68-76.

Von Barga KW, Lohrey L, Cramer B, Humpf HU (2012) Analysis of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin in cereals samples using $^{13}\text{C}_2$ -moniliformin and high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 60: 3586-3591.

Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD, Coutinho TA (2008) Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*: a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* 37:319-334.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A POKKAH BOENG DA CANA-
DE-AÇÚCAR NO BRASIL**

Marileide M. Costa^a, Maruzanete P. Melo^b, Sarah da Silva Costa^a, Ludwig H. Pfenning^a

^aDepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa postal 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brasil.

^bDepartamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina, PI, Brasil.

Manuscrito preparado para submissão à revista *Tropical Plant Pathology*.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), tendo a cultura grande expressão econômica e social. Entre as doenças fúngicas, que podem trazer prejuízos no setor canavieiro tem-se a *Pokkah boeng*, causada por espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Os sintomas são a deformação na parte aérea e podridão do colmo. Apesar dos sintomas da *Pokkah boeng* serem eventualmente observados em plantações de cana no Brasil, existem apenas registros não oficiais da doença. Os objetivos do presente trabalho foram (i.) averiguar a diversidade de espécies do FFSC associadas a *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar no Brasil, usando filogenia molecular, cruzamentos em laboratório e avaliação da morfologia (ii.) testar a patogenicidade em plantas de cana-de-açúcar, sorgo, milho e milheto e (iii) avaliar o potencial da espécie *F. sacchari* em produzir fumonisinas B₁, B₂ e moniliformina *in vitro*. Por meio de análise filogenética dos genes *fator de alongação 1- α* e segunda maior subunidade da RNA polimerase II, compatibilidade sexual e caracterização morfológica, os 39 isolados obtidos de plantas com sintomas de *Pokkah boeng* foram identificados como *F. sacchari*, *F. proliferatum* e uma nova linhagem filogenética *Fusarium* sp. Cruzamentos de isolados obtidos do campo com os respectivos testadores resultaram na formação de peritécios férteis das espécies *F. sacchari* e *F. proliferatum*, confirmando a identidade das espécies. Nos cruzamentos entre os 10 isolados de *Fusarium* sp. houve produção de peritécios férteis, indicando a ocorrência de nova espécie biológica no FFSC. Em isolados de *Fusarium* sp., quando cruzados com testadores das outras espécies do FFSC, a formação de peritécios não foi observada, indicando a presença de barreira reprodutiva. As três espécies identificadas induziram sintomas de *Pokkah boeng* quando inoculadas em plantas de cana-de-açúcar e causaram podridão de colmo em plantas de milho, sorgo e milheto, indicando que não existe especificidade em relação ao hospedeiro, apenas afinidade. Entre os isolados de *F. sacchari* avaliados foi observada a produção de traços de moniliformina e alta concentração de fumonisina B1. Os resultados obtidos esclarecem a etiologia da *Pokkah boeng* no Brasil e subsidiam programas de seleção e de melhoramento de germoplasma vegetal visando resistência à doença, além de gerar a base de conhecimento necessário para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para o monitoramento e diagnose da doença. A linhagem *Fusarium* sp. será formalmente descrita e elevada ao nível de espécie, pois representa uma nova espécie filogenética e biológica no FFSC.

Palavras-chave: *Fusarium fujikuroi* species complex. *Saccharum officinarum*. Micotoxinas. Filogenia molecular.

ABSTRACT

Brazil is the world's biggest producer of sugar cane (*Saccharum officinarum*). Among the diseases caused by fungi is cited pokkah-boeng, caused by species belonging to the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC). The most typical symptoms of the disease are a morphological deformation of the aerial part of the plant and stem rot. While the occurrence of symptoms is eventually reported in plantations in Brazil, official reports of the disease don't exist. In this study we investigated (i.) what species of the FFSC occur in association with sugar-cane plants with symptoms of pokkah-boeng in Brazil, using a two gene molecular phylogeny, sexual compatibility and analysis of morphological markers; (ii.) if the species cause disease in plants of sugar-cane, maize, sorghum and millet; (iii.) the potential of *Fusarium sacchari* in producing the toxins fumonisin B₁, B₂ and moniliformin *in vitro*. According to the phylogenetic analysis of the gene regions elongation factor *1- α* and RPB2, sexual compatibility and morphological markers, the 39 isolates studied were identified as *F. sacchari*, *F. proliferatum* and another still unknown phylogenetic lineage, sister of *Fusarium andiyazi*. Crossing isolates of *F. sacchari* and *F. proliferatum* from the field with available tester strains produced fertile perithecia and viable ascospores. Crossings between 10 isolates of the unknown lineage also produced fertile perithecia and viable ascospores. When crossed with tester strains of other known mating populations of the FFSC, no perithecia were observed, giving evidence that this new lineage represents also a new biological species within the FFSC. All three species induced symptoms of pokkah-boeng when inoculated in sugar-cane plants and caused stem rot in maize, sorghum and millet. Probably, there is no specificity of those species with regard to host plants, only affinity. Among isolates of *F. sacchari* the production of elevated levels of fumonisin B₁ and traces of moniliformin was observed. The findings confirm the etiology of pokkah-boeng in Brazil and will give support to breeding programs aiming the selection of resistant germplasm. The results also generated basic knowledge for the development of strategies for diagnosis and monitoring of the disease. The new species will be described, based on the application of the phylogenetic and biological species concept.

Key Words: *Fusarium fujikuroi* species complex. *Saccharum officinarum*. Molecular Phylogeny. Mycotoxins.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é afetada em várias regiões do mundo por uma doença conhecida como *Pokkah boeng*, que tem como agente etiológico diversas espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi* species complex - FFSC), como *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* (Leslie & Summerell, 2006; Siddique 2007; Siti Nordahliawate et al., 2008; Lin et al., 2014).

Enquanto em países como Indonésia e Malásia essa doença é bem conhecida, no Brasil, apesar de ser um importante produtor da cultura, existem apenas registros não oficiais da doença. Não foi encontrada literatura primária sobre esse patossistema no Brasil. Sintomas da doença podem ser eventualmente observados em plantações de cana no país, através da deformação e podridão da parte aérea das plantas, no entanto, sua etiologia não foi formalmente esclarecida.

Embora o nome da espécie seja sugestivo para um hospedeiro específico, a espécie *F. sacchari* já foi encontrada em plantas cultivadas como milho, arroz e sorgo, onde causa podridão em raízes, além de ocorrer como endófito em gramíneas selvagens (Hsuan et al., 2011; Sharma et al., 2011).

Como espécies do FFSC são conhecidas produtoras de micotoxinas, o risco de sua ocorrência em cana precisa ser avaliado. Têm sido relatadas as micotoxinas beauvericina, ácido fusárico e moniliformina e fumonisina sendo produzidas por espécies do FFSC (Leslie et al., 1992; Bacon et al., 1996; Moretti et al., 1996).

A proposta desse estudo foi (i.) averiguar a diversidade de espécies do FFSC associados à *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar de diferentes regiões do Brasil, usando filogenia molecular multilocus e teste de compatibilidade sexual;

(ii.) testar a patogenicidade das espécies encontradas em plantas de cana-de-açúcar, sorgo, milho e milheto e (iii.) verificar a capacidade de produção das micotoxinas fumonisina e moniliformina por *F. sacchari*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de isolados e preservação

Foi composta uma coleção de 39 isolados de *Fusarium* obtidos de cana-de-açúcar com sintomas de *Pokkah boeng* coletadas em diferentes regiões produtoras do Brasil (Tabela 1). Os isolados foram depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil (<http://www.dfp.ufla.br/cml/>). Foram incluídos isolados de referência e testadores de espécies do FFSC disponíveis na CML (Tabela 1).

Tabela 1 Isolados de *Fusarium* provenientes da cana-de-açúcar de diferentes regiões geográficas do Brasil, isolados testadores e de referência usados neste estudo. (Continua)

Espécie	Código CML^a	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Data do isolamento	MAT^d	EF-1α^c	Rpb2^d
<i>F. proliferatum</i>	3548	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2014	1	x	x
<i>F. proliferatum</i>	3572	<i>Saccharum officinarum</i>	Palmeiras do Piauí, PI	2015	1	x	x
<i>F. sacchari</i>	3158	<i>Saccharum officinarum</i>	Cristália, MG	2014	1	x	---
<i>F. sacchari</i>	3159	<i>Saccharum officinarum</i>	Cristália, MG	2014	Nd ^e	x	---
<i>F. sacchari</i>	3160	<i>Saccharum officinarum</i>	Cristália, MG	2014	Nd	x	---
<i>F. sacchari</i>	3161	<i>Saccharum officinarum</i>	Cristália, MG	2014	Nd	x	x
<i>F. sacchari</i>	3205	<i>Bromelia balansae</i>	Cristália, MG	2014	1	x	---
<i>F. sacchari</i>	3232	<i>Saccharum officinarum</i>	Cristália, MG	2014	Nd	x	---
<i>F. sacchari</i>	3320	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2015	1	x	x
<i>F. sacchari</i>	3556	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2014	1	x	---
<i>F. sacchari</i>	3557	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2014	1	x	---
<i>F. sacchari</i>	3558	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2014	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3559	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2014	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3560	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2014	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3562	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2014	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3563	<i>Saccharum officinarum</i>	Miguel Alves, PI	2015	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3564	<i>Saccharum officinarum</i>	Miguel Alves, PI	2015	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3565	<i>Saccharum officinarum</i>	Teresina, PI	2015	Nd	x	---
<i>F. sacchari</i>	3566	<i>Saccharum officinarum</i>	Caaporã, PB	2015	1	x	---
<i>F. sacchari</i>	3567	<i>Saccharum officinarum</i>	Caaporã, PB	2015	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3568	<i>Saccharum officinarum</i>	União, PI	2015	2	x	---

Tabela 1, Continua

Espécie	Código CML^a	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Data do isolamento	MAT^d	EF-1α^c	Rpb2^d
<i>F. sacchari</i>	3569	<i>Saccharum officinarum</i>	Coelho Neto, MA	2015	2	x	x
<i>F. sacchari</i>	3570	<i>Saccharum officinarum</i>	Coelho Neto, MA	2015	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3571	<i>Saccharum officinarum</i>	Coelho Neto, MA	2015	1	x	x
<i>F. sacchari</i>	3573	<i>Saccharum officinarum</i>	Palmeiras do Piauí, PI	2015	1	x	---
<i>F. sacchari</i>	3574	<i>Saccharum officinarum</i>	Palmeiras do Piauí, PI	2015	Nd	x	---
<i>F. sacchari</i>	3575	<i>Saccharum officinarum</i>	Palmeiras do Piauí, PI	2015	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3576	<i>Saccharum officinarum</i>	Guadalupe, PI	2015	2	x	---
<i>F. sacchari</i>	3577	<i>Saccharum officinarum</i>	Lagoa de Itaengá, PE	2016	1	---	---
<i>Fusarium</i> sp.	3561	<i>Saccharum officinarum</i>	Araras, SP	2015	2	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	3578	<i>Saccharum officinarum</i>	Araras, SP	2015	2	x	x
<i>Fusarium</i> sp.	3579	<i>Saccharum officinarum</i>	Araras, SP	2015	2	x	x
<i>Fusarium</i> sp.	3580	<i>Saccharum officinarum</i>	Araras, SP	2015	2	x	x
<i>Fusarium</i> sp.	3581	<i>Saccharum officinarum</i>	Araras, SP	2015	2	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	3582	<i>Saccharum officinarum</i>	Piracicaba, SP	2015	2	x	x
<i>Fusarium</i> sp.	3583	<i>Saccharum officinarum</i>	Piracicaba, SP	2015	2	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	3584	<i>Saccharum officinarum</i>	Piracicaba, SP	2015	1	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	3585	<i>Saccharum officinarum</i>	Araras, SP	2015	2	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	3586	<i>Saccharum officinarum</i>	Araras, SP	2015	2	x	x
<i>F. sacchari</i>	768T ^f	<i>Saccharum officinarum</i>	Estados Unidos	---	2	x	
<i>F. sacchari</i>	769T	<i>Saccharum officinarum</i>	Estados Unidos	---	1	x	---

Tabela 1, conclusão

Espécie	Código CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Data do isolamento	MAT	EF-1 α	Rpb2
<i>F. verticillioides</i>	766T	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	---	2	x	---
<i>F. verticillioides</i>	767T	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	---	1	x	---
<i>F. proliferatum</i>	770T	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	---	2	x	---
<i>F. proliferatum</i>	771T	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	---	1	x	---
<i>F. andiyazi</i>	884	<i>Sorghum bicolor</i>	Etiópia	---	2	x	---
<i>F. verticillioides</i>	1896	<i>Zea mays</i>	Castro, PR	2010	---	---	---
<i>F. proliferatum</i>	3038	<i>Brachiaria brizantha</i>	Lavras, MG	2013	2	x	---
<i>F. andiyazi</i>	2740	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas, MG	2011	1	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	2755	<i>P. americanum</i>	Luiz Ed. Magalhães, BA	2012	Nd	x	---
<i>F. andiyazi</i>	2756	<i>Sorghum bicolor</i>	Sete Lagoas, MG	2012	1	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	2783	<i>Sorghum bicolor</i>	Lavras, MG	2013	1	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	2802	<i>Sorghum bicolor</i>	Maurilândia, GO	2013	2	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	2809	<i>Sorghum bicolor</i>	Indianópolis MG	2013	1	x	---
<i>F. andiyazi</i>	2812	<i>Zea mays</i>	Rio Verde GO	---	1	x	---
<i>Fusarium</i> sp.	3041	<i>Brachiaria brizantha</i>	Lavras, MG	2012	2	x	---
<i>F. andiyazi</i>	3044	<i>Brachiaria brizantha</i>	Lavras, MG	2012	1	x	---

^a**CML**: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; ^b**MAT**: *Mating type* dos isolados identificados por PCR. *MAT-1* = 1; *MAT-2* = 2 ^c**EF-1 α** : Fator de elongação 1- α ; ^d**Rpb2**: Segunda maior subunidade da RNA polimerase. ^e**Nd**: Não definido. ^f**T**: Isolado tipo.

2.2 Caracterização morfológica

A caracterização e identificação dos isolados foram realizadas de acordo com o 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 depositadas sobre o meio SNA colocado em placas de Petri de 60 mm de diam. Para cada isolado, foram realizadas três repetições. Foram tomadas medições das estruturas vegetativas e comparadas com descrições na literatura.

2.3 Extração de DNA, PCR e análises filogenéticas

Os fungos foram cultivados em meio líquido de extrato de malte 2% por três dias em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com o uso do kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Brasil, São Paulo, BR), de acordo com as especificações do fabricante.

A amplificação do fragmento do gene fator de alongação-1 α (*EF-1 α*) foi realizada utilizando os *primers*: EF1 (forward; 5-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC - 3) e EF2 (reverse; 5-

GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3) (O'Donnell et al., 1998). Para a amplificação do fragmento da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*Rpb2*) foram utilizados os *primers* 5F2 (forward; 5-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3) e 7cR (reverse; 5-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3) (O'Donnell et al., 2008). As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler TM (BIO-RAD). As condições de ciclo para *EF-1 α* foram: 94°C por 1 min; 34 ciclos: 94°C por 30 s, 62°C por 45 s, 72°C por 1 min; 72°C, por 5 min (O'Donnell et al., 1998). Para *Rpb2*, o programa de ciclos foi: 94°C por 90 s; 40 ciclos: 94°C por 30 s, 55°C por 90 s, 68°C por 2 min; 68°C por 5 min (O'Donnell et al., 2008). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil, São Paulo, BR) para, posteriormente, serem sequenciados.

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa MacroGen, USA. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany) (Hepperle, 2011) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information - NCBI, por meio da ferramenta BLAST. Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos das espécies de *Fusarium* foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementada pelo programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de máxima parcimônia (MP) por meio do programa MEGA 5. Foram feitas análises para cada região gênica em separado e para sequências combinadas, utilizando 1000

replicações. Sequências de referência correspondentes aos genes *EF-1a* e *RPB2* de espécies do FFSC previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises (Tabela 2). Sequências de *F. oxysporum* e *F. inflexum* foram utilizadas como *outgroup*.

Tabela 2 Sequências de espécies do FFSC correspondentes às regiões gênicas *EF-1 α* e *Rpb2* depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Código	Hospedeiro/ Substrato	Origem	<i>EF-1α</i>^e	<i>Rpb2</i>^f
<i>F. andiyazi</i> T ^g	CBS ^a 119857	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	KR071718	KT 154004
<i>F. andiyazi</i>	CBS 119856	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	KR0717201	---
<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 ^d 25446	<i>Striga asiatica</i>	Madagascar	AF160265	---
<i>F. circinatum</i>	NRRL 25331	<i>Pinus radiata</i>	Estados Unidos	AF160295	JX171623
<i>F. fractiflexum</i>	NRRL 28852	<i>Cymbidium</i> sp.	Japão	AF160288	---
<i>F. fujikuroi</i>	NRRL 13566	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan	AF160279	JX171570
<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	JX171583
<i>F. mangiferae</i>	NRRL 25226	<i>Mangifera indica</i>	Índia	AF160281	JX171622
<i>F. musae</i>	NRRL 25059	<i>Musa</i> sp.	Honduras	FN552086	FN552108
<i>F. nygamai</i> T	NRRL 13448	<i>Sorghum bicolor</i>	Austrália	AF160273	EF470114
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 22902	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Estados Unidos	AF160312	---
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22944	<i>Cattleya</i> sp.	Alemanha	AF160280	JX171617
<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> T	NRRL 13999	<i>Saccharum officinarum</i>	Índia	AF160278	JX171580
<i>F. subglutinans</i>	NRRL 22016	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	AF160289	JX171599
<i>F. temperatum</i>	MUCL ^c 52450	<i>Zea mays</i>	Bélgica	HM067687	---
<i>F. thapsinum</i>	NRRL 22045	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	AF160270	JX171600
<i>F. tuiense</i> T	CML ^b 262	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	DQ452859	---
<i>F. verticillioides</i>	MUCL 43479	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	FN54360	FN552100

^a**CBS:** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands. ^b**CML:** Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; ^c**MUCL:** Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain, Louvain, Belgium; ^d**NRRL:** Northern Regional Research Laboratory, NCAUR, Peoria, Illinois; ^e***EF-1 α* :** Fator de elongação 1- α ; ^f***Rpb2*:** Segunda maior subunidade da RNA polimerase; ^g**T:** isolado tipo.

2.4 Teste de homotalismo, identificação de *mating type* e indução da fase sexuada

Para realização do teste de homotalismo, isolados monospóricos foram cultivados em placas de Petri contendo meio cenoura ágar (CA) e incubados a 25 °C no escuro por sete dias. Após o período de incubação, foram transferidos 2mL de solução de Tween 80 a 2,5% (v/v) na superfície das colônias e espalhados utilizando uma alça de Drigalski, de modo que umedecesse completamente o micélio. As culturas foram incubadas a 20°C, sob luz constante, por aproximadamente 40 dias. Avaliações foram feitas semanalmente, verificando o surgimento de peritécios e exsudação de ascósporos. Os testes foram repetidos para a confirmação dos resultados (adaptado de Leslie & Summerell, 2006 e Covert et al., 2007).

Após o teste de homotalismo, para realização dos cruzamentos, os idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2* foram identificados utilizando *primers* e condições de amplificação de Steenkamp et al. (2000). Foram utilizados os *primers* GFmat1a e GFmat1b para amplificar o idiomorfo *MAT-1* (200 pb), e GFmat2c e GFmat2d para amplificar o idiomorfo *MAT-2* (800 pb). Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Biotium®) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, com posterior visualização realizada em um transiluminador. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador de comprimento de fragmentos de 1 Kb do tipo “ladder”. As reações de PCR foram repetidas duas vezes para cada isolado, sendo o *mating type* confirmado apenas quando, nas duas reações, fossem obtidos os mesmos resultados.

Os isolados com *mating types* identificados foram cruzados com isolados testadores de *mating types* opostos das espécies *F. proliferatum* e *F. sacchari* (Tabela 1). Isolados da mesma espécie foram também cruzados entre si para confirmação da espécie biológica. Os cruzamentos foram realizados de

acordo com metodologia padrão para estudo de compatibilidade sexual no FFSC (Leslie & Summerell, 2006). Os isolados usados como parental masculino foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio completo e incubados a 20°C sob fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Os isolados usados como parental feminino foram cultivados em placas de Petri (60 mm) contendo meio cenoura ágar e incubados a 25 °C no escuro por sete dias. Após o período de incubação foi preparada uma suspensão de esporos usando o parental masculino pela adição de 1 mL de solução de Tween 80 e água destilada esterilizada a 2,5% (v/v). Em seguida, a suspensão foi depositada na superfície da colônia do isolado usado como parental feminino e por meio de uma alça de Drigalski, espalhado de modo a umedecer completamente o micélio. Os cruzamentos foram incubados a 20 °C, com fotoperíodo de 12 h de luz branca fluorescente combinada com luz negra, por um período de até cinco semanas. Foram considerados férteis os cruzamentos que produziram peritécios com exsudação de ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos três vezes para confirmação dos resultados. As estruturas da fase sexuada foram caracterizadas, realizando medição do diâmetro do peritécio, comprimento e largura dos ascos e de ascósporos e verificação do número de septos. Foram realizadas 20 medições de cada estrutura, as quais serviram para a comparação com as outras espécies biológicas de FFSC já descritas na literatura.

A viabilidade dos ascósporos foi avaliada pelo teste de germinação em ágar-água 2%. Utilizando um estilete, cirros de ascósporos foram coletados, depositados na superfície do meio e espalhados com alça de Drigalski. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25 °C no escuro por 24 h. Após o período de incubação, a germinação dos ascósporos foi avaliada em microscópio de luz.

2.5 Perfil de micotoxinas dos isolados

Para avaliação da habilidade de produzir fumonisinas (FB₁, FB₂) e moniliformina seis isolados de *F. sacchari* foram cultivados em 50 g de canjiquinha de milho, acondicionados em frascos erlenmeyer junto com 20 mL de água destilada e autoclavados duas vezes por 30 min a 121 °C. Após o resfriamento, o milho foi inoculado com discos de ágar coletados a partir da margem das colônias de cada isolado com sete dias crescidos em SNA e 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 moído e armazenado a 4°C até o uso. Os controles foram tratados da mesma maneira, exceto que eles não foram inoculados.

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 01 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, quatro soluções foram preparadas (0.25, 0.5, 1.0 e 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). Os tempos 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 de 5 mL dos extratos 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

Para testar a patogenicidade sete isolados representantes das espécies encontradas nesse estudo, *F. proliferatum*, *F. sacchari* e *Fusarium* sp., e um isolado de referência das espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (Tabela 1) foram inoculados na cultivar RB867515 de *S. officinarum*. Para a obtenção do inóculo, os isolados foram cultivados em placas de Petri de 9 cm, contendo meio BDA, e mantidos por seis dias sob uma temperatura de 25 °C no escuro. Após esse período foi preparada uma suspensão de esporos na concentração de 2×10^6 conídios/mL. Dois métodos de inoculação foram utilizados, um por meio da imersão dos colmos em suspensão de conídios e o outro pela aspersão do inóculo nas axilas das folhas. Para o primeiro método, gemas de colmos de cana desinfestados com hipoclorito de sódio a 0,26 % por 30 min foram imersas em 500 mL da suspensão de esporos durante 12 horas, em seguida foram transplantados para vasos. No método de aspersão do inóculo nas axilas das folhas, foi realizada a aspersão da suspensão de esporos nas axilas das plantas com dois meses de plantio (adaptado de Siti Nordahliawate et al., 2008).

Os tratamentos (isolados) foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições. As avaliações foram realizadas 15, 30, 60, 120 e 180 dias após a inoculação. Os estádios da doença foram avaliados e caracterizados de acordo com uma escala modificada proposta por Siti Nordahliawate et al. (2008) (Tabela 3). O postulado de Koch foi completado por meio do reisolamento e sequenciamento dos isolados inoculados.

Tabela 3 Descrição dos sintomas para avaliação da patogenicidade de isolados de *Fusarium* em cana-de-açúcar.

Sintomas
1-Sintoma não visível
2-Clorose branda em folhas jovens
3-Plantas com sintomas de encarquilhamento nas folhas
4-Plantas com sintomas de encarquilhamento nas folhas e/ou manchas avermelhadas alternadas com áreas cloróticas
5-Plantas com sintomas de encarquilhamento, enrugadas, com folhas mal desenvolvidas e podridão

2.7 Avaliação da patogenicidade em sorgo, milho e milheto

Para testar a especificidade, seis isolados representantes das espécies encontradas nesse estudo *F. proliferatum*, *F. sacchari* e *Fusarium* sp. e das espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (Tabela 1) foram inoculados em colmos de duas cultivares de milho (BRS1040 e 30F35Y), duas de sorgo (BR304 e DKB551) e uma de milheto (BRS1501). A inoculação foi feita seguindo o método do palito imerso proposto por Damicone et al. (1988) com algumas modificações.

Sementes previamente submetidas à desinfestação ou termoterapia foram semeadas em vasos perfurados com a capacidade de 1 L, contendo solo + substrato. Após semeadura, os vasos (cada um contendo duas sementes a 1 cm de profundidade) foram mantidos em casa de vegetação. As plantas foram inoculadas na fase de pré-pendoamento (aproximadamente 45 dias após o

plântio), 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 uma semana a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. 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 podridão de colmo foi realizada 30 dias após a inoculação, para isso os colmos foram cortados longitudinalmente e cada um dos entrenós inoculados foram avaliados com auxílio de uma escala diagramática com notas variando de 1 a 8 (Nicolli et al., 2015).

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

A topologia das árvores filogenéticas obtidas pelo método de *Máxima Parcimônia* para as regiões genômicas *EF-1 α* e *Rpb2* em separado e para a combinação das regiões foram congruentes e a árvore combinada é mostrada na Figura 1.

Na análise de sequências parciais do gene *EF-1 α* (Figura 1A - Anexo) 36 isolados agruparam-se em três clados distintos. Vinte e quatro isolados agruparam-se junto ao isolado de referência de *F. sacchari* e dois isolados junto ao de *F. proliferatum*. Um clado adicional bem suportado com 92 % de *bootstrap* foi composto por 10 isolados, formando um grupo irmão com *F. andiyazi*, descrito no presente documento como *Fusarium* sp. Com base no agrupamento gerado pela região *EF-1 α* , um grupo de 11 isolados foi selecionado para a geração de sequências de *Rpb2* (Figura 2B - Anexo) e condução de testes de patogenicidade.

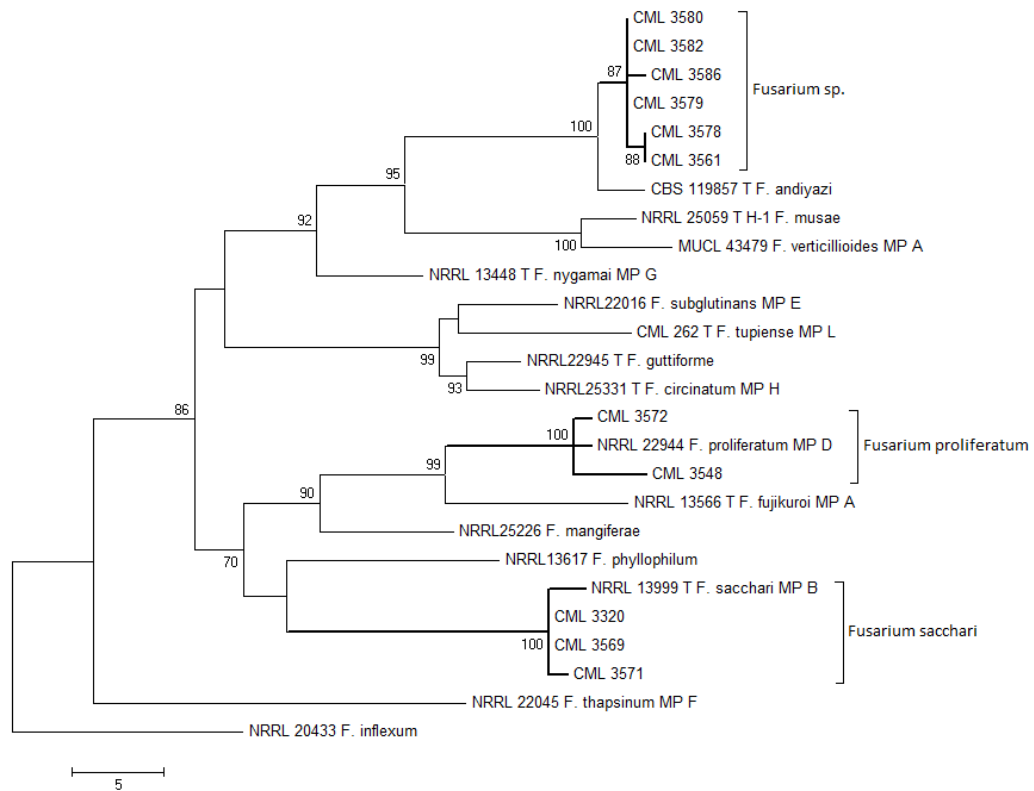


Figura 1 Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de sequências combinadas dos genes *EF-1α* e *Rpb2* de isolados de *Fusarium* obtidos nesse trabalho e isolados de referência pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CBS- Centraal bureauvoor Schimmel cultures. MP - Mating population. CML: Coleção Micológica de Lavras; MUCL: Mycothèque de l'Université; NRRL: *Northern Regional Research Laboratory*.

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

Os dois isolados de *F. proliferatum* possuem o idiomorfo *MAT-1*. Para os 27 isolados de *F. sacchari*, nove foram identificados como idiomorfo *MAT-1* e 12 como idiomorfo *MAT-2*. Para os isolados da linhagem *Fusarium* sp., nove isolados apresentaram idiomorfo *MAT-2* e um isolado apresentou idiomorfo *MAT-1* (Tabela 1). Nos cruzamentos, os isolados de *F. proliferatum* e de *F. sacchari* produziram peritécios férteis com respectivos isolados testadores duas semanas após a realização dos cruzamentos (Tabela 1A - Anexo). Nos cruzamentos entre os 10 isolados de *Fusarium* sp., todos produziram peritécios férteis quando cruzados entre si (Tabela 1A - Anexo). Os ascósporos exsudados pelos peritécios de todos os cruzamentos férteis de todas as espécies avaliadas mostraram-se viáveis, germinando após 12 h de incubação. Os isolados de *Fusarium* sp., quando cruzados com testadores de outras espécies do FFSC, não produziram peritécios.

3.3 Caracterização morfológica

Os caracteres macroscópicos e micromorfológicos da fase assexuada dos isolados das espécies *F. proliferatum* e *F. sacchari* foram de acordo com a descrição da literatura (Leslie & Summerell, 2006; Marasas et al., 2001). Ambas as espécies se caracterizam por produzir macroconídios em esporodóquios e não produzir clamidósporo.

Fusarium sacchari caracteriza-se pela produção de microconídios em polifiálides (Figura 2) compartilhando marcadores morfológicos com outras espécies do FFSC, como *F. subglutinans* e *F. temperatum*. Já *F. proliferatum* produz cadeias curtas de microconídios a partir de polifiálides (Figura 2), morfotipo de *F. fujikuroi* e *F. phyllophilum*.

As estruturas da fase sexuada foram semelhantes para os isolados representantes das espécies *F. proliferatum* e *F. sacchari* apresentando características morfológicas descritas para as espécies (Kuhlman, 1982; Leslie et al., 2005).

Nas características morfológicas da fase assexuada de *Fusarium* sp, a presença de pseudoclamidósporos (Figura 2), monofiálides longas e formação de microconídios em cadeia media e longa (Figura 2) permitiram diferenciá-lo de *F. sacchari* e *F. proliferatum*. Os microconídios produzidos apresentaram formato variando de clavado para ovoide e tamanho de 5-13,2 x 1,6-5 µm. Quando produzidos em cadeia apresentaram 0-1 septo, quando em falsas cabeças apresentaram geralmente 1 septo. Os macroconídios apresentaram célula apical pouco curvada, célula basal pediculada com 3-5 septos, a maioria com 3 septos e tamanho variando de 20-42,5 x 2,5-5 µm.

Na fase sexuada de *Fusarium* sp. os peritécios apresentaram-se negros, arredondados a ovais, com aspecto verrugoso, geralmente únicos, mas ocasionalmente agrupados. Ascus fusiformes, contendo geralmente 8 ascósporos. Os ascósporos hialinos, apresentando formato clavado a ovóide (Figura 2). O formato dos ascósporos foi semelhante aos conídios produzidos pela espécie. As medições de suas características morfológicas foram comparadas com as outras espécies de *Fusarium* que correspondem às *mating populations* já descritas (Tabela 2 - Anexo).

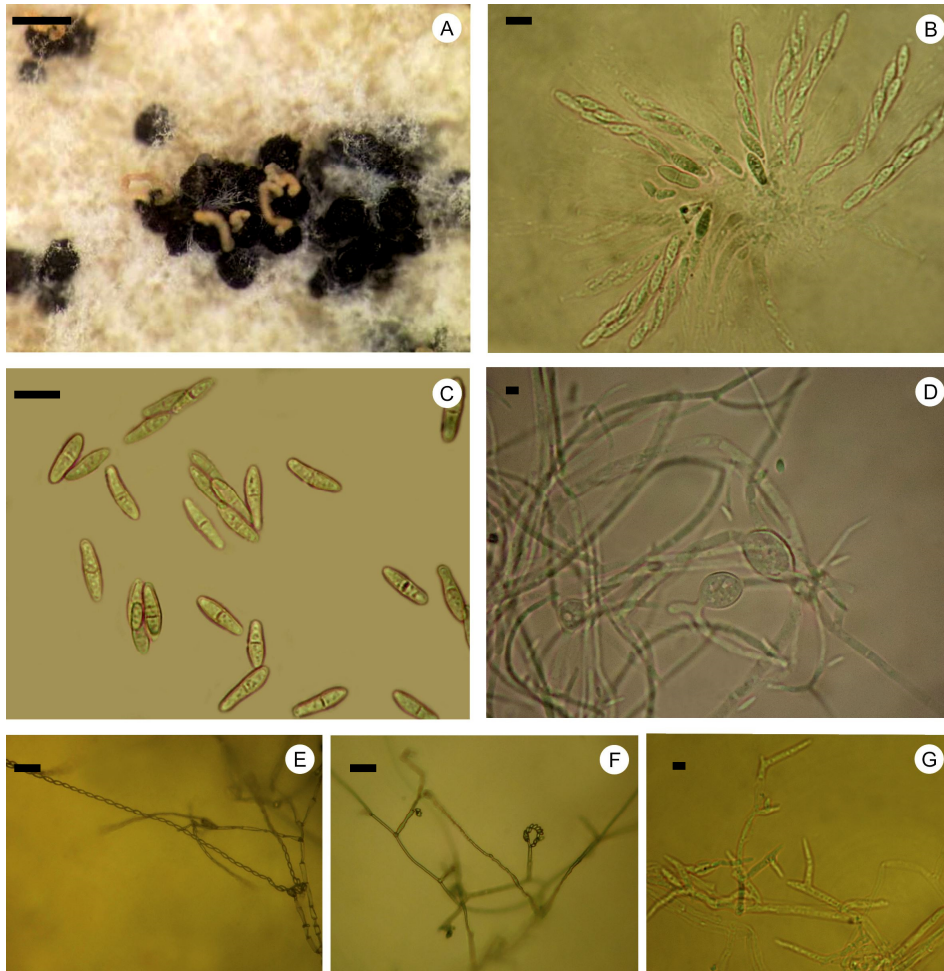


Figura 2 Marcadores morfológicos das espécies de *Fusarium*. A-E. *Fusarium* sp. A. Peritécios exsudando ascósporos Barra = 300 μm ; B. Ascospores Barra = 20 μm ; C. Ascósporos Barra = 10 μm ; D. Pseudoclamidósporo Barra = 10 μm ; E. Cadeias longas de microconídios Barra = 20 μm ; F. Cadeias curtas de microconídios de *F. proliferatum*, Barra = 20 μm ; G. polifialides de *F. sacchari*, Barra = 10 μm .

3.4 Perfil de micotoxinas dos isolados

Os perfis de micotoxinas de isolados da espécie *F. sacchari* associados à cana-de-açúcar, com respeito à produção de moniliformina e fumonisinas (FB₁ e FB₂) são apresentados na Tabela 4.

Dois de seis isolados de *F. sacchari* avaliados produziram traços de moniliformina. Apenas um isolado produziu alta concentração de fumonisina B1, enquanto nenhum dos isolados produziu fumonisina B2. Nas amostras de milho usadas como controle negativo foram encontradas apenas quantidades traço de FB₁ (3 ug/gr) e nada de FB₂ e moniliformina.

Tabela 4 Perfis de micotoxinas de isolados da espécie *Fusarium sacchari* associados à cana-de-açúcar, com respeito a produção de moniliformina e fumonisinas (FB₁ e FB₂).

Código	MON ($\mu\text{g/g}$) ^a	FB₁ ($\mu\text{g/g}$) ^b	FB₂ ($\mu\text{g/g}$) ^c
CML3159	ND	ND	ND
CML3160	2,1	ND	ND
CML3157	5,55	ND	ND
CML3161	ND	ND	ND
CML690	ND	ND	ND
CML768	ND	337,2	ND

^(a)Moniliformina, limite de detecção: 1 $\mu\text{g/g}$

^(b)Fumonisina B₁, limite de detecção: 1 $\mu\text{g/g}$

^(c)Fumonisina B₂, limite de detecção: 1 $\mu\text{g/g}$

ND: não detectado

3.5 Teste de patogenicidade

Os sete isolados representantes das espécies *F. proliferatum* e *F. sacchari* e a nova linhagem *Fusarium* sp. induziram sintomas em plantas de cana-de-açúcar. As plantas inoculadas apresentaram sintomas distintos, variando de acordo com o método de inoculação, mas não de acordo com a espécie inoculada. Não foi observado sintoma nas plantas inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* (CML 1896) utilizado como controle.

As plantas derivadas de colmos inoculados antes do plantio começaram a demonstrar sintomas de podridão no colmo logo que as brotações emergiram. As plantas com 120 dias de inoculação começaram a apresentar clorose nas folhas, se tornando enrugadas e demonstrando podridão na parte apical (Figura 3). Os perfilhos derivados dessas plantas apresentaram podridão interna. Durante o período de crescimento, algumas das plantas se recuperaram, resultando em plantas sem sintomas visíveis.

As plantas inoculadas dois meses após o plantio apresentaram sintomas com 15 dias de inoculação. A sintomatologia observada variou entre as plantas, mas geralmente manifestou-se através da clorose das folhas, retorcimento da parte apical, seguido de podridão. Em alguns casos, houve quebra de dominância apical, impedindo o desenvolvimento normal da planta. Para esse método de inoculação, alguns perfilhos derivados dessas plantas apresentaram brotações laterais. Para os dois métodos de inoculação, nas folhas das plantas inoculadas observaram-se lesões cloróticas e perfuradas e surgimento de micélio esbranquiçado nas áreas lesionadas.

O isolado CML 3578, representante da nova linhagem *Fusarium* sp., foi o que mais causou podridão de colmo nos perfilhamentos das plantas inoculadas antes do plantio, observando-se sintomas em todas as plantas. Os isolados CML

3567 e CML 3569 (*F. sacchari*) e CML 3548 (*F. proliferatum*) induziram sintomas de enrugamento e podridão da parte aérea para ambos os métodos de inoculação.

Não foi possível observar sintoma característico para uma determinada espécie. Após a avaliação foi realizado o reisolamento dos patógenos e a identidade confirmada através do sequenciamento, completando o postulado de Koch.

3.6 Avaliação da patogenicidade em sorgo, milho e milheto

No teste de especificidade todos os seis isolados representantes das espécies obtidas neste trabalho, *F. proliferatum*, *F. sacchari* e *Fusarium* sp., mais os isolados de referência das espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum* induziram lesões necróticas em colmos de milho, sorgo e milheto (Figura 3). Houve interação significativa ($p < 0.05$) entre o fator isolado/cultivar (Tabela 6).

Os isolados representantes da espécie *F. sacchari* (CML 768, CML 3569) apresentaram maior média de severidade quando inoculados na cultivar de milho 30F35Y (39,63%) e nas cultivares de sorgo, BR 304 e DKB551, com média de 43,80% para ambas cultivares, e apresentando média estatisticamente igual para as demais cultivares. Para o isolado de *F. proliferatum* (CML 3548) foi observada menor severidade na cultivar de milho 30F35Y (27,13%). Para as demais cultivares, as médias de severidade foram estatisticamente iguais. Para a nova linhagem *Fusarium* sp., maiores níveis de severidade foram observados para a cultivar de milheto BRS 1501 (64,63 %), seguido da cultivar de sorgo DKB551 (47,96 %). O isolado CML 1896, representante da espécie *F. verticillioides*, apresentou altos e iguais níveis de severidade em todas as cultivares avaliadas.

De acordo com os níveis de severidade, não foi possível estabelecer uma relação entre cultivares. As cultivares apresentaram médias de severidade estatisticamente iguais, quando na junção das médias de todos os isolados inoculados. Em todos os reisolamentos realizados nos colmos das cultivares de milho, sorgo e milheto, os isolados recuperados foram identificados com base na morfologia, completando os postulados de Koch.

Tabela 5 Média de severidade dos isolados de *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. sacchari* e *Fusarium* sp. inoculados em colmos de milho, sorgo e milheto.

Isolado	Cultivar									
	30F35Y		BRS1040		BRS1501		DKB551		BR304	
CML 1896	52,13	Ba	39,63	Ba	47,96	Ba	43,80	Ba	43,80	Ba
CML 3038	39,63	Ba	43,80	Ba	52,13	Ba	39,63	Ba	39,63	Ba
CML 768	39,63	Bb	22,96	Aa	31,80	Aa	43,80	Bb	43,80	Bb
CML 3578	31,30	Aa	35,46	Ba	64,63	Cc	47,96	Bb	26,53	Aa
CML 3548	27,13	Aa	43,80	Bb	31,30	Ab	43,80	Bb	43,80	Bb
CML 3569	39,63	Bb	27,13	Aa	39,63	Ab	27,13	Aa	52,13	Bb
Media	38,24	Ba	35,46	Ba	44,57	Ba	41,02	Ba	41,61	Ba
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 diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). Cultivares de sorgo (BR 304 e DKB 551), milho (BRS 1040 e 30F35Y) e milheto (BRS 1501). Isolados de *F. verticillioides* (CML 1896), *F. proliferatum* (CML 3038, CML 3548), *F. sacchari* (CML 768, CML 3569) e *Fusarium* sp. (CML 3578).

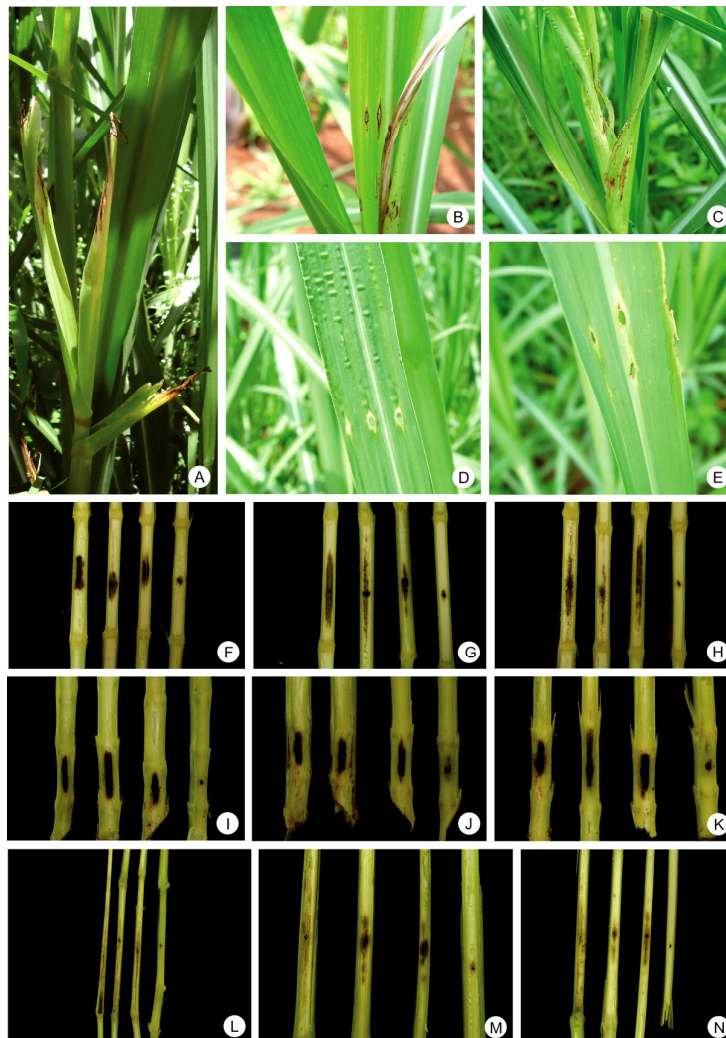


Figura 3 Sintomas de *Pokkah boeng* em plantas de cana-de-açúcar e de podridão de colmo em milho, sorgo e milheto; A-E. clorose das folhas, retorcimento da parte apical e podridão da parte apical; F-H. Sintomas de *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *Fusarium* sp com seus respectivos controles inoculados em milho; I-K. Sintomas de *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *Fusarium* sp. com seus respectivos controles inoculados em sorgo; L-K. Sintomas de *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *Fusarium* sp. inoculados em sorgo.

4 DISCUSSÃO

Os resultados das análises filogenéticas dos genes *EF-1α* e *Rpb2*, teste de patogenicidade, cruzamentos e morfologia permitiram identificar três diferentes agentes etiológicos da *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar no Brasil, que pertencem ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC), *F. proliferatum*, *F. sacchari* e uma nova linhagem nomeada neste estudo como *Fusarium* sp. Essas espécies foram patogênicas à cana-de-açúcar e causaram podridão em colmo de milho, sorgo e milheto.

Entre os 39 isolados obtidos de plantas de cana-de-açúcar com sintoma de *Pokkah boeng*, predominou a espécie *F. sacchari*, sendo representada por 27 isolados, seguido da nova linhagem, *Fusarium* sp., com dez isolados e *F. proliferatum* com dois isolados. Nos estados da região nordeste predomina a espécie *F. sacchari*, enquanto a nova linhagem *Fusarium* sp. prevalece na região sudeste, no estado de São Paulo, único lugar onde foi relatada até o presente momento (Tabela 1).

Nas análises filogenéticas das regiões gênicas individuais e combinadas dos genes *EF-1α* e *Rpb2*, os 10 isolados de *Fusarium* sp. formaram um clado que é grupo irmão de *F. andiyazi* (Figura 1). O que hoje representa o nome *F. andiyazi* pode se tratar de um complexo de espécies. Isolados de *F. andiyazi* obtidos de sorgo proveniente de EUA, Camarões e Uganda avaliados por meio da técnica de AFLP agruparam-se em três clusters e em duas subpopulações, que representam provavelmente espécies distintas que compartilham caracteres morfológicos com *F. andiyazi*, ainda não descritas formalmente (Bushula et al., 2015). Provavelmente *Fusarium* sp. relatada neste trabalho pertence a um desses grupos dentro de *F. andiyazi*, representando uma nova linhagem do FFSC. A linhagem *Fusarium* sp. ocorre também em outros hospedeiros, como sorgo, milho, milheto e *Brachiaria*. (Figura 3A - Anexo). Em contraste a *F. andiyazi*,

que é o principal patógeno do sorgo e possui um número mais restrito de hospedeiros.

As espécies *F. sacchari* e *F. proliferatum* já foram encontradas em associação com *Pokkah boeng* em países da Ásia, como Indonésia e Malásia (Siddique 2007; Siti Nordahliawate et al., 2008; Lin et al., 2014). Contudo, este o primeiro registro oficial da etiologia da *Pokkah boeng* no Brasil e o relato de uma nova linhagem associada à doença.

Marcadores morfológicos da espécie *F. sacchari* são a formação de microconídios a partir de polifialídes, enquanto em *F. proliferatum* os microconídios são formados em polifialídes e cadeias curtas. Em *Fusarium* sp. foram observados a presença de pseudoclamidósporos e a formação de microconídios em cadeias médias e longas. Em torno de 10% dos microconídios apresentam um septo. Algumas características morfológicas de *Fusarium* sp. são compartilhadas pela espécie *F. andiyazi*. A presença de microconídios septados em cadeia precisa ser melhor investigada, podendo torna-se um marcador que diferencie as duas espécies, já que essa característica morfológica não é relatada em *F. andiyazi*.

As espécies *F. proliferatum*, *F. sacchari* representam duas espécies biológicas distintas dentro do FFSC. Cruzamentos em laboratório entre isolados de *F. proliferatum* e *F. sacchari* com os respectivos testadores geraram cruzamentos férteis. Quando cruzados com testadores da outra espécie, não se formaram peritécios férteis, evidenciando que ocorre barreira reprodutiva entre as duas populações.

A presença de peritécios de *F. sacchari* (isolado CML 3320) em plantas com sintomas de *Pokkah boeng* indica que a reprodução sexuada da espécie ocorre naturalmente. Outra evidência para esse fato é a presença de ambos os idiomorfos *MAT* com frequência parecida entre os isolados avaliados. Este é o primeiro relato da reprodução sexuada de *F. sacchari* ocorrendo em condições

de campo. A reprodução sexual contribui para o aumento da variabilidade genética da espécie e pode influenciar a ocorrência de epidemias (Palacios et al., 2015).

Os cruzamentos entre os isolados de *Fusarium* sp. levaram à formação de peritécios férteis, com a produção de ascósporos viáveis, confirmando que essa população representa também uma espécie biológica dentro do FFSC. Os cruzamentos entre isolados dessa espécie com testadores de outras espécies do FFSC não geraram peritécios, indicando a presença de barreira reprodutiva. A morfologia dos ascósporos de *Fusarium* sp. pode ser considerada um marcador para essa possível nova espécie, uma vez que se diferencia de todas as outras espécies biológicas do FFSC (Booth, 1971; Kuhlman, 1982; Klittich et al., 1997; Leslie et al., 2005; Lima et al., 2012).

Fusarium proliferatum, *F. sacchari* e *Fusarium* sp. foram patogênicas à cana-de-açúcar, ou seja, existe um complexo de espécies capazes de induzir sintomas de *Pokkah boeng* na cultura. Quando as plantas foram inoculadas na parte aérea, apresentaram clorose nas folhas, retorcimento seguido de podridão da parte apical e lesões perfuradas. Nessa forma de inoculação foram observados sintomas severos, pois ocorreu quebra de dominância e morte da parte apical da planta, impedindo o desenvolvimento vegetativo, não sendo observada podridão de colmo.

Na inoculação dos colmos, à medida que as plantas se tornavam mais velhas, além da podridão do colmo, os demais sintomas descritos anteriormente também eram observados, indicando a capacidade do fungo colonizar sistemicamente planta. Um estudo conduzido na Indonésia mostrou que, através da injeção do inóculo de *F. sacchari* no colmo das plantas e imersão dos colmos no inóculo, as plantas também desenvolveram sintomas de clorose e retorcimento das folhas jovens, mas não de podridão do colmo (Siti et al., 2008).

A colonização sistêmica da cana-de-açúcar pelas espécies relatadas nesse estudo se traduz em importância epidemiológica, uma vez que o movimento de colmos infestados pode resultar na introdução das espécies de *Fusarium* para novas áreas no Brasil. Segundo Leslie e Summerell (2006), *F. sacchari* tem a capacidade de sobreviver em tecidos meristemáticos por longos períodos e é disseminado via colmos infectados.

As espécies *F. proliferatum*, *F. sacchari* e *Fusarium* sp. patogênicas a cana-de-açúcar induziram sintoma de podridão em milho, sorgo e milheto, confirmando serem potenciais patógenos dessas culturas. O primeiro relato de uma espécie em um hospedeiro não deve ser traduzido em uma relação de especificidade, uma vez que, *F. sacchari* já foi relatada causando podridão em raízes de milho, arroz e sorgo, induzindo sintoma da doença *bakanae* em arroz, além de ocorrer como endófito em gramíneas selvagens (Leslie & Summerell, 2006; Zainudin et al., 2008; Petrovic et al., 2013). *Fusarium proliferatum* é relatado causando podridão em sorgo (Ploetz, 2006; Dos Reis et al., 2010). A capacidade desses fungos de infectar diferentes hospedeiros é relevante para o seu estabelecimento em determinada área e na disseminação para novas áreas e safras subsequentes da cultura principal instalada. Como exemplo pode-se citar a cultura do sorgo, pois atualmente cresce o interesse pela produção comercial de etanol a partir da fitomassa de sorgo sacarino cultivado na entressafra da cana-de-açúcar.

Os isolados de *F. sacchari* identificados nesse trabalho foram capazes de produzir traços de moniliformina em testes *in vitro* e o isolado CML 768 produziu 337,2 µg/g de fumonisina B1, valor considerado alto para essa micotoxina em espécies como *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, conhecidas produtoras de fumonisina (Da Silva et al., 2004; Leslie et al., 2005; Sharma et al., 2011). *Fusarium sacchari* é relatada como produtora das micotoxinas beauvericina, ácido fusárico e moniliformina, mas não fumonisina (Leslie et al.,

1992; Bacon et al., 1996; Moretti et al., 1996). Portanto, este é primeiro relato da produção da micotoxina fumonisina pela espécie *F. sacchari*.

O alto valor de fumonisina B1 apresentado pelo isolado de *F. sacchari* pode ser explicado pela utilização da canjiquinha de milho como substrato para crescimento do fungo e posterior detecção da micotoxina. O milho possivelmente tornou o ambiente favorável para a produção de fumonisina, uma vez que a capacidade de produzir determinada micotoxina é inerente à espécie, mas a quantidade produzida pode estar relacionada ao ambiente, como o substrato, pH e outras condições de crescimento do fungo. A biossíntese de fumonisinas ocorre de forma ideal em pH baixo, sendo o milho um bom substrato, pois devido aos ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo do amido, o pH torna-se baixo (Miller, 2001).

A produção de fumonisina por *F. sacchari*, potencial patógeno das culturas do milho, sorgo e milheto como aqui relatado, traz uma atenção maior para essa espécie, uma vez que a produção de micotoxinas em grãos de milho e de sorgo pode interferir negativamente na produção e qualidade dos grãos, além de ser fator de risco a saúde de animais e humanos, com efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos (Leslie, 1995; Nirenberg & O'Donnell, 1998; Desjardins, 2006).

Em conclusão, definimos que a *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar no Brasil é causada pelas espécies *F. sacchari*, *F. proliferatum* e uma nova linhagem descrita como *Fusarium* sp. Essas espécies não são específicas à cana-de-açúcar, causando podridão em plantas de milho, sorgo e milheto e a espécie *F. sacchari* é produtora da micotoxina fumonisina.

Os resultados obtidos esclarecem a etiologia da *Pokkah boeng* no Brasil e subsidiam programas de seleção e de melhoramento de germoplasma vegetal visando resistência à doença, além de gerar a base de conhecimento necessário

para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para o monitoramento e diagnose da doença.

PERSPECTIVAS

Descrever formalmente a linhagem *Fusarium* sp. como uma nova espécie do complexo *Fusarium fujikuroi*, com nome de *Fusarium claudionori*.

Avaliar o perfil das micotoxinas fumonisina e moniliformina dos isolados representantes de *Fusarium claudionori*.

REFERÊNCIAS

- Bacon CW, Porter JK., Norred WP, Leslie JF (1996) Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4039-4043.
- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureau [for the] Commonwealth Mycological Institute, Farnham Royal, England.
- Bushula V, Leslie JF, Little CR (2015) Genetic diversity in *Fusarium andiyazi* populations from sorghum. *Phytopathology* 105 (Suppl. 4):S4.21.
- 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.
- Damicone PJ, Vineis PD, Manning WJ (1988) Cross-Pathogenicity of *Fusarium moniliforme* isolates from corn and asparagus. *Plant Disease* 14:774-777.
- Desjardins AE (2006). *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota U.S.A, 260 p.
- Doko MB, Rapior S, Visconti A, Schjoth JE (1995) Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:429-434.
- 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 of the Science of Food and Agriculture* 90:1445-1451.
- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039-1042.
- Hsuan HM, Salleh B, Zakaria L (2011) Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences* 12:6722-6732.

Klaasen JA, Nelson PE (1996) Identification of a mating population, *Gibberella nygamai* sp. nov, within the *Fusarium nygamai* anamorph. Mycologia 88:965–969.

Klittich CJR, Leslie JF, Nelson PE, Marasas WFO (1997) *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section Liseola from sorghum. Mycologia 89:643-652.

Kuhlman EG (1982) Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section Liseola. Mycologia 74:759-768.

Leslie JF (1995) *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. Canadian Journal of Botany 73(Suppl. 1):282-291.

Leslie JF, Plattner RD, Desjardins AE, Klittich CJR (1992) Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). Phytopathology 82:341-345.

Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Malden: Blackwell, USA, 420 p.

Leslie JL, Summerell B, Doe FJ (2005) Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*. Mycologia 97:718-724.

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.

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF (2012) *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. Mycologia 104:1408-1419.

Lin Z, Xu S, Que S, Wang Y, Comstock JC, Wei J, McCord PH, Chen B, Chen R, Zhang M (2014) Species-specific detection and identification of *Fusarium* species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China. Plos one 9:1-13.

Marasas WFO, Rheeder JP, Lamprecht SC, Zeller KA (2001) *Fusarium andiyazi* sp. nov. a new species from sorghum. Mycologia 93: 1203-1210.

Miller JD (2001) Factors that affect the occurrence of fumonisin. Environmental Health Perspectives, Department of Chemistry, Ottawa-Carleton Institute of Chemistry, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada. Environ Health Perspect 109(Suppl. 2): 321-324.

Moretti A, Logrieco A, Dottalico A, Ritieni A, Fogliano V, Randazzo G (1996) Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). Sydowia 48:44-56.

Nicoli A, Costa RV, Cota LV, Silva DD, Zambolim L, Lanza FE, Guimarães, DP, Landau EC (2015) Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose do colmo do milho. Ciência Rural 45:1720-1726.

Nirenberg HI, O'Donnell K. (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:434-458.

O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM (2008) Molecular phylogenetic diversity; multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. Journal Clinical Microbiological 46:2477-2490.

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

Palacios AS, Susca A, Haidukowski M, Stea G, Cendoya E, Ramírez ML, Chulze SN, Farnochi, MC, Moretti A, Torres AM (2015) Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina. International Journal of Food Microbiology 201:35-41.

Parich A, Boeira LS, Castro SP, Krska R (2003) Determination of moniliformin using SAX Column Clean-up and HPLC/DAD-detection. Mycotoxin Research 19:203-206.

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

Ploetz RC (2006) *Fusarium*-Induced disease of tropical, perennial crops. Phytopathology 96:648-652.

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

Sharma R, Thakur RP, Senthilvel S, Nayak S, Reddy V, Rao VP, Varshney RK (2011) Identification and characterization of toxigenic Fusaria associated with Sorghum grain mold complex in India. Mycopathologia 171:223-230

Sherphard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA (1990) Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescent detection. Journal of Liquid Chromatography 13: 2077-2087.

Siddique S (2007) Pathogenicity and aethiology of *Fusarium* species associated with pokkah boeng disease on sugarcane. Thesis University of Malaysia, Malaysia. Universiti Sains Malaysia.

Siti Nordahliawate MS, Nur Ain Izzati MZ, Azmi AR, Salleh B (2008) Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. Pertanika Journal Tropical Agricultural Sciences 31:279-286.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22: 4673-4680.

Van Hove F, Waalwijk C, Logrieco A, Munaut F, Moretti A (2011) *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. Mycologia 103:570-585.

Zeller KA, Summerell BA, Bullock S, Leslie JF (2003) *Gibberella konza* (*Fusarium konzae*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* complex. Mycologia 95:943-954.

MATERIAL COMPLEMENTAR

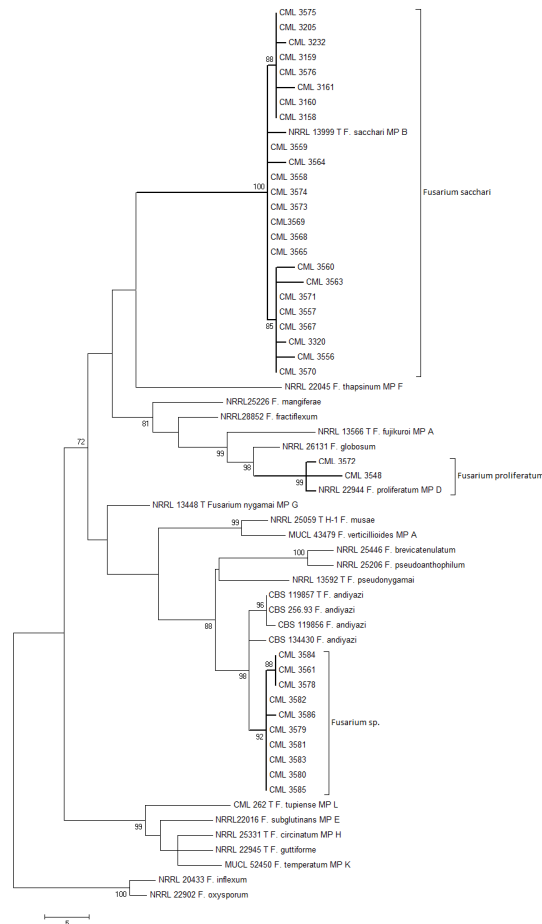


Figura 1A Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de sequências do gene *EF-1α* de isolados de *Fusarium* obtidos nesse trabalho e de isolados de referência pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CBS- Central bureauvoor Schimmel cultures. MP - Mating population. CML: Coleção Micológica de Lavras; MUCL: Mycothe`que de l'Universite; NRRL: *Northern Regional Research Laboratory*.

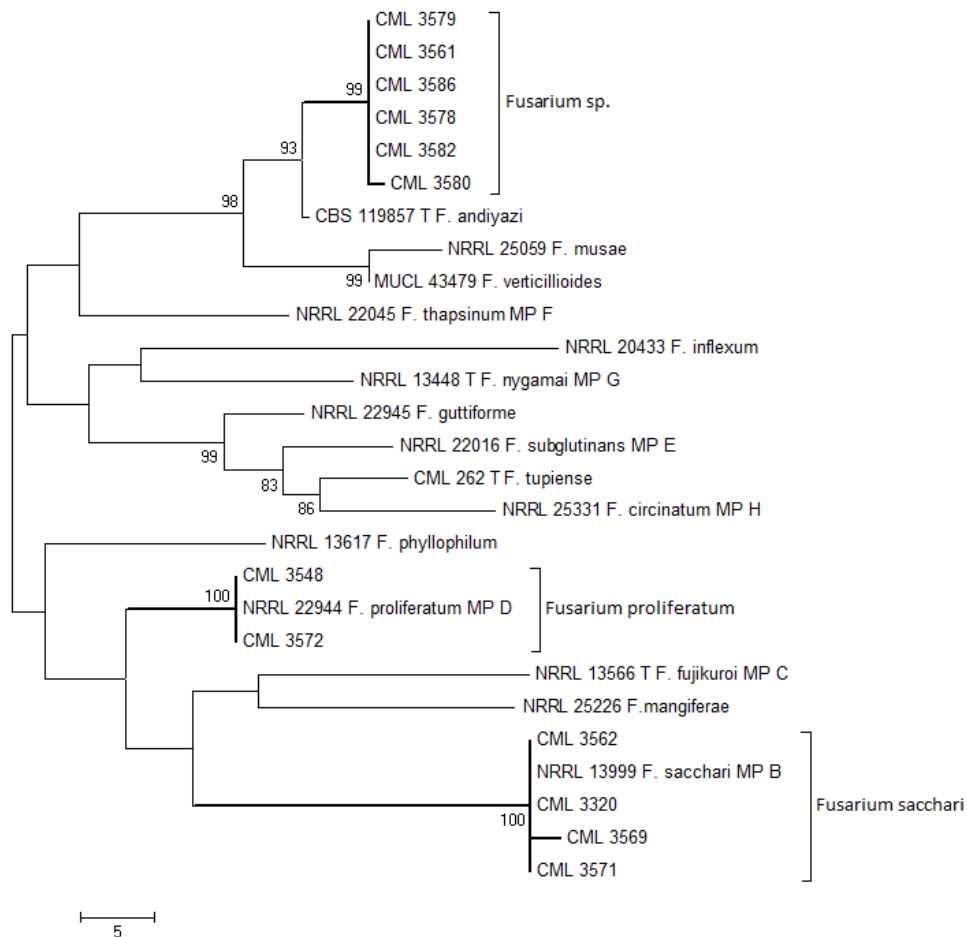


Figura 2A Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de sequências do gene *RPB2* de isolados de *Fusarium* obtidos nesse trabalho e de isolados de referência pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CBS- Centraal bureauvoor Schimmel cultures. MP - Mating population. CML: Coleção Micológica de Lavras; MUCL: Mycothèque de l'Université; NRRL: Northern Regional Research Laboratory.

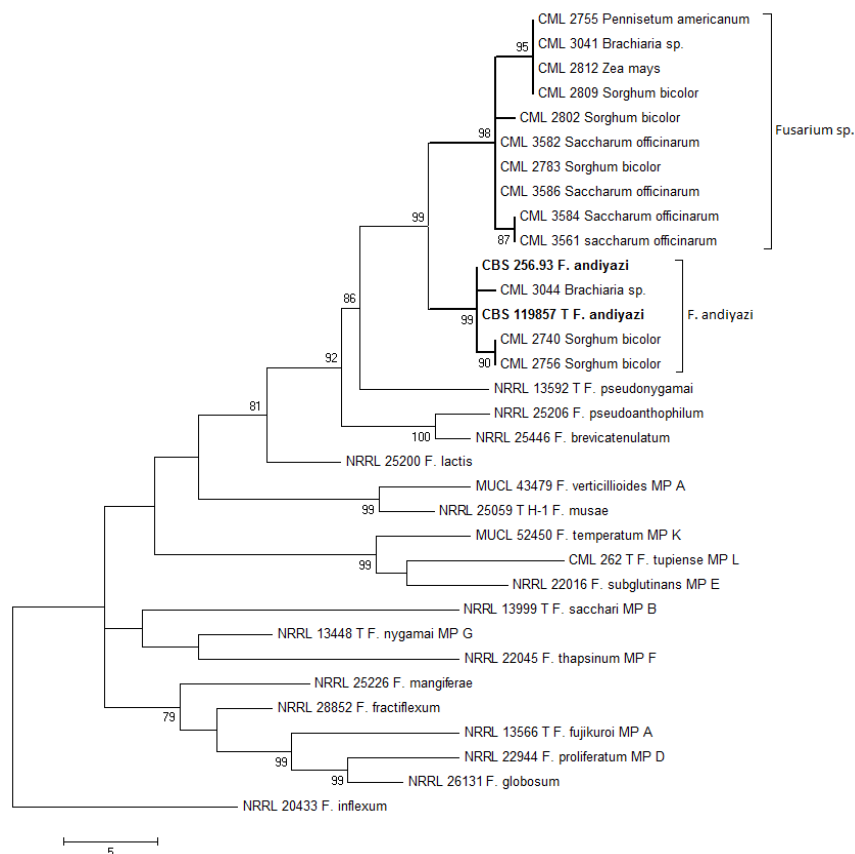


Figura 3A Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de sequências do gene *EF-1a* de isolados de *Fusarium* sp. obtidos neste trabalho e das culturas *Brachiaria* sp., *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Pennisetum americanum*, e isolados de referência pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CBS- Centraal bureauvoor Schimmel cultures. MP - Mating population. CML: Coleção Micológica de Lavras; MUCL: Mycothèque de l'Université; NRRL: Northern Regional Research Laboratory.

Tabela 1A Relação dos cruzamentos entre isolados das espécies *F. proliferatum*, *F. sacchari* com seus respectivos testadores e entre isolados da linhagem *Fusarium* sp.

Espécie	♀ (MAT-1) ^a	♂ (MAT-2) ^b	♀ (MAT-2) ^c	♂ (MAT-1) ^d
<i>F. proliferatum</i>			CML 770	x CML 3548 x CML 3572
<i>F. sacchari</i>	CML 769	x CML 3558	CML 768	x CML 3158
	CML 769	x CML 3559	CML 768	x CML 3556
	CML 769	x CML 3560	CML 768	x CML 3557
	CML 769	x CML 3562	CML 768	x CML 3566
	CML 769	x CML 3563	CML 768	x CML 3571
	CML 769	x CML 3564	CML 768	x CML3573
	CML 769	x CML 3567	CML 768	x CML3577
	CML 769	x CML 3568	CML 768	x CML 3305
	CML 769	x CML 3569	CML 768	x CML 3320
	CML 769	x CML 3570		
	CML 769	x CML 3575		
	CML 769	x CML 3576		
<i>Fusarium</i> sp.	CML 3584	x CML 3561	CML 3561	x CML 3584
	CML 3584	x CML 3578	CML 3578	x CML 3584
	CML 3584	x CML 3579	CML 3579	x CML 3584
	CML 3584	x CML 3580	CML 3580	x CML 3584
	CML 3584	x CML 3581	CML 3581	x CML 3584
	CML 3584	x CML 3582	CML 3582	x CML 3584
	CML 3584	x CML 3583	CML 3583	x CML 3584
	CML 3584	x CML 3585	CML 3585	x CML 3584
	CML 3584	x CML 3586	CML 3586	x CML 3584

^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

Tabela 2 A Características morfológicas das espécies biológicas conhecidas dentro do FFSC

Ascósporos						
Espécie ^a	MP ^b	Peritécio ^c (µm)	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Septação	Referências
<i>F. verticillioides</i>	A	228 x 460	12–23	4–6	1–4; 3 mais frequente	Kuhlman 1982
<i>F. sacchari</i>	B	250–390 x 270–390	28–32	3–4.5	0–1	Leslie et al. 2005
<i>F. fujikuroi</i>	C	140 x 300	10–20	4–7	1–3; 1 mais frequente	Kuhlman 1982
<i>F. proliferatum</i>	D	280 x 520	10–21	4–7	1–3; 1 mais frequente	Kuhlman 1982
<i>F. subglutinans</i>	E	220 x 350	11–21	3.5–6	1–4; 1 mais frequente	Booth 1971
<i>F. thapsinum</i>	F	180 x 480	12–22	4–8	0–3; 1 mais frequente	Klittich et al., 1997
<i>F. nygamai</i>	G	184 x 238	8.5–20	4–8	0–1; 1 mais frequente	Klaasen & Nelson 1996
<i>F. circinatum</i>	H	230 x 325	9.4–16.6	4.5–6	1–2	Nirenberg & O'Donnell 1998
<i>F. konzum</i>	I	360–780 x 360–840	12–18	4–7	0–1	Zeller et al., 2003
<i>F. xylarioides</i>	J	230 x 350	9–16	4–6	1–3; 1 mais frequente	Booth 1971
<i>F. temperatum</i>	K	170–310 x 215–405	13–22	4,5–6	1–2; 1 mais frequente	Scaufaire et al., 2011
<i>F. tupaense</i>	L	310–360 x 350–400	12.5–17.5	5–6	1–3; 1 mais frequente	Lima et al., 2012
<i>F. musae</i>	M	250–420 x 220–260	10–22	4–9	1	Van Hove et al., 2011
<i>Fusarium</i> sp. ^d	?	340-450 x 220-430	15-20	5-7,5	1	Neste estudo

^a Espécies biológicas do FFSC

^b Designação alfabética adotada para as espécies biológicas do FFSC. Indica a ordem pela qual as mating populations foram descritas

^c Largura x altura

^d *Fusarium* sp. corresponde à espécie biológica (mating population) associada a *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar no Brasil