



ANA CAROLINE DE SOUSA BARROS

**ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS AO MILHETO
GRANÍFERO**

**LAVRAS – MG
2023**

ANA CAROLINE DE SOUSA BARROS

ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS AO MILHETO GRANÍFERO

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

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

**LAVRAS - MG
2023**

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

Barros, Ana Caroline de Sousa.

Espécies de *Fusarium* associadas ao milheto granífero / Ana
Caroline de Sousa Barros. - 2022.

47 p. : il.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. *Pennisetum glaucum*. 2. mofo da panícula. 3. podridão do
colmo. I. Pfenning, Ludwig Heinrich. II. Título.

ANA CAROLINE DE SOUSA BARROS

ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS AO MILHETO GRANÍFERO

***Fusarium* SPECIES ASSOCIATED WITH MILLET**

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

Lavras MG, 07 de dezembro de 2022.

Dr. Edson Ampélio Pozza

UFLA

Dr. José Maria Villela Pádua

UFLA

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

**LAVRAS - MG
2023**

Esta dissertação é dedicada a todos que acreditam na ciência e contribuem para o avanço do conhecimento na sociedade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me abençoado durante a minha trajetória.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realizar meu mestrado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Um agradecimento a todos os professores pelo conhecimento transmitido, contribuindo com minha formação acadêmica.

Agradeço aos membros da banca por terem aceito o convite e pela colaboração nesse trabalho.

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Ludwig H. Pfenning por sua confiança, atenção, conselhos e muito conhecimento transmitido.

Gratidão a meu amigo João Victor Corso por todo apoio na condução deste trabalho, pela paciência e colaboração. Agradeço também aos meus colegas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos: Glaucia, Janaína, Arianna, Ana Carolina, Bárbara, Mikaely, Egídio, Ana Luísa, Victoria e Edson, sem o apoio e trabalho em equipe, eu jamais teria concluído todas as etapas desse mestrado.

Agradeço aos meus pais, Ana Elsa e José Antônio, pelo apoio e incentivo por todos esses anos, que foram essenciais para o meu desenvolvimento pessoal e contribuíram para que eu buscasse ser melhor a cada dia. Gratidão também à Caroline Bordon, pela parceria e apoio em todos os momentos.

Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O milho granífero é uma cultura importante nas regiões áridas e semiáridas pois é uma planta rústica, possui boa adaptabilidade a seca e desenvolve em solos com baixa fertilidade. O destino do cereal é para alimentação animal, humana e é muito utilizado como cobertura morta no sistema plantio direto. Entre os fungos que ocorrem em associação com a cultura, são espécies de *Fusarium* que podem causar doença ou comprometer a qualidade e segurança dos grãos. A literatura primária sobre a associação milho – *Fusarium* é escassa, enquanto ocorreu considerável expansão da cultura no Brasil em tempo recente. Nesse estudo, foi investigado quais espécies de *Fusarium* estão associadas ao milho granífero no Brasil, quais espécies induzem o mofo da panícula e a podridão do colmo. Cerca de 160 isolados, obtidos de panículas e colmos com e sem sintomas ou sinais, provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil, foram caracterizados por meio de avaliação de seus marcadores morfológicos, análise de filogenia molecular de sequências da região gênica *tef1*, teste de patogenicidade e bioensaio. Foi possível identificar 13 diferentes espécies de *Fusarium*, que pertencem a dois complexos distintos. *Fusarium neosemitectum* e outras espécies do *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex FIESC induzem mofo da panícula no milho. As espécies de *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC podem eventualmente produzir micotoxinas e não induzir o sinal do mofo, enquanto espécies de FFSC e FIESC podem induzir podridão do colmo. A partir do conhecimento obtido é possível identificar e monitorar os agentes etiológicos, desenvolver estratégias para mitigar o possível dano e contribuir para o manejo fitossanitário. Será possível, ainda, subsidiar programas de melhoramento que visam a seleção de híbridos resistentes.

Palavras-chave: Doença de planta. Filogenia molecular. Mofo da panícula. *Pennisetum glaucum*. Podridão do colmo.

ABSTRACT

Grain millet is an important crop in arid and semi-arid regions, as it is a rustic plant that is resistant to drought and grows in soils with low fertility. The destination of the cereal is for animal and human food. Among the fungi that occur in association with the crop are *Fusarium* species that can cause disease or compromise the quality and safety of grains. The primary literature on the millet-*Fusarium* association is scarce, while there has been considerable expansion of the culture in Brazil in recent times. In this study, it was investigated which *Fusarium* species are associated with grain millet in Brazil, which species induce panicle mold and stem rot. About 160 isolates, obtained from panicles and stems with and without symptoms or signs, from different producing regions of Brazil, were characterized by evaluating their morphological markers, analysis of molecular phylogeny of sequences from the *tef1* gene region, pathogenicity test and bioassay. It was possible to identify 13 different species of *Fusarium*, which belong to two distinct complexes. *Fusarium neosemitectum* and other species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* FIESC species complex induce panicle mold in millet. Species from the *Fusarium fujikuroi* FFSC species complex may eventually produce mycotoxins and not induce the mold signal, while FFSC and FIESC species can induce stem rot. Based on the knowledge obtained, it is possible to identify and monitor the etiological agents, develop strategies to mitigate possible damage and contribute to phytosanitary management. It will also be possible to subsidize breeding programs aimed at selecting resistant hybrids.

Key Words: Head mould. Molecular phylogeny. *Pennisetum glaucum*. Plant disease. Stem rot.

SUMÁRIO

	Capítulo 1	9
1	Introdução	9
2	Estado da arte	11
2.1	A cultura do milheto granífero.....	11
2.2	<i>Fusarium</i> associado à panícula de gramíneas	12
2.3	<i>Fusarium</i> associado ao colmo de gramíneas	13
	Referências	14
	Capítulo 2	18
	Resumo	18
	Introdução	22
	Material e Métodos	23
	Resultados	27
	Discussão	30
	Conclusão	32
	Agradecimentos	32
	Referências	33

Capítulo 1

1 Introdução

A cultura do milheto granífero (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.) é milenar nas regiões áridas e semiáridas dos continentes Asiático e Africano devido à sua rusticidade, resistência a seca e tolerância a solos com baixa fertilidade. Nessas partes do mundo, o grão se destina à alimentação humana e animal (Yadav e Rai 2013). Outras espécies que compõem o grupo dos milhetos ou “millets” são *Setaria italica* (foxtail millet), *Eleusine carocana* (finger millet) e *Panicum miliaceum* (proso millet). A expansão da cultura no território brasileiro se deu mais recentemente, mas o milheto granífero ocupa atualmente área plantada de 500.000 hectares por ano (ATTO 2022). O grão se destina à alimentação de animais como ingrediente de ração ou como silagem, mas também é utilizado como cobertura do solo no sistema plantio direto (Bastos et al. 2002; Santos et al. 2017). Neste sistema, o plantio do milheto traz vantagens, como por exemplo a cobertura morta, manutenção de água e matéria orgânica no solo, evita erosão, além da supressão da densidade e diversidade de plantas daninhas (Araújo et al. 2021), e oferece uma excelente opção para a rotação de cultura, elevando o potencial produtivo dos plantios do Cerrado (Corrêa e Sharma 2004). Recentemente o seu uso na alimentação humana foi regulamentado no Brasil com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 493/2021 na qual foi autorizado o uso do milheto como ingrediente para produzir diversos produtos alimentícios tais como biscoitos e massas (ANVISA 2021). Os benefícios do uso de milheto na fabricação de produtos alimentícios e na alimentação humana foi instruído pelo trabalho de Dias-Martins et al. (2018).

Entre os desafios para alcançar boa produtividade e qualidade do milheto, coloca-se o manejo fitossanitário. Vários fungos foram registrados em associação com o milheto, que requerem controle e manejo. Doenças foliares economicamente relevantes são causadas por *Bipolaris setariae* (mancha foliar), *Pyricularia grisea* (brusone), *Puccinia substriata* (ferrugem) e *Sclerospora graminicola* (míldio). Como doenças fúngicas secundárias são consideradas a mancha foliar causada por *Cercospora penniseti*, ergot ou mela causado por *Claviceps fusiformis* e o carvão *Tolyposporium penicillariae* (Kaurav et al. 2018). Por se tratar de cultura em expansão, a ocorrência e frequência dessas doenças em plantações Brasileiras ainda precisam ser avaliadas. Não existe literatura primária disponível.

Assim como em outras gramíneas, existe uma elevada diversidade de espécies de *Fusarium* em associação com o milheto, como patógeno, endófito, saprófita na panícula ou

potencial produtor de micotoxinas. Uma das doenças documentadas é a podridão do colmo e da panícula (Oniyke 1991; Wilson 2002).

Várias espécies de *Fusarium*, que pertencem principalmente aos complexos *Fusarium fujikuroi* FFSC e *Fusarium incarnatum-equiseti* FIESC colonizam a panícula e os grãos de gramíneas onde podem causar podridão e mofo (Houissa et al. 2019; Leslie et al. 2005; Vismer et al. 2019; Wilson et al. 2006). As espécies de *Fusarium* são conhecidas por produzir diversas micotoxinas, metabólitos secundários altamente tóxicos a vertebrados, que podem acumular no organismo, mesmo quando ingeridos em quantidades muito baixas (Leslie et al. 2005; Proctor et al. 2009; Villani et al. 2016).

As principais micotoxinas produzidas por *Fusarium* são fumonisinas, tricotecenos e zearalelona. A ocorrência de uma espécie potencialmente micotoxigênica em grãos é sempre um alerta sobre uma possível contaminação do produto e seus derivados. Um estudo realizado na Etiópia evidenciou que a micotoxina zearalenona prevaleceu em maiores concentrações nas amostras de sorgo e do grupo do milheto, finger millet (Chala et al. 2014). Em associação com o grupo dos millets ocorre aparentemente grande diversidade de espécies de *Fusarium* dos complexos FFSC e FIESC, mas que não foram identificadas nesse estudo (Chala et al. 2019). Na Coreia foram encontradas as toxinas zearalenona, deoxinivalenol e nivalenol em proso millet, do grupo dos milhetos (Choi et al. 2021).

Na fase pós-colheita, as condições adequadas de armazenamento do milheto granífero em baixo teor de umidade, são decisivas para evitar a contaminação por zearalenona e outras micotoxinas (Jurjevic et al. 2007). Essa toxina tem a capacidade de causar danos ao sistema reprodutivo de animais (Rai et al. 2019). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina limites máximos toleráveis (LMT) para esses contaminantes em alimentos. No último documento publicado em fevereiro de 2021 em alimentos destinados a alimentação infantil o LMT para zearalenona (ZEA) foi de 20 mcg/kg nos alimentos (ANVISA, 2021). Portanto, considerando o destino do milheto granífero à alimentação humana e animal, a qualidade e segurança dos grãos requer atenção especial.

Esse estudo tem por objetivo responder as seguintes questões: i. quais espécies de *Fusarium* podem ser encontradas em associação com o milheto granífero no Brasil? ii. quais espécies causam mofo da panícula? iii. quais espécies de *Fusarium* em associação com a panícula podem produzir micotoxinas? iv. quais espécies causam a podridão do colmo? A partir do conhecimento obtido é possível desenvolver estratégias para mitigar o possível dano e

contribuir para o manejo fitossanitário. Será possível, ainda, subsidiar programas de melhoramento para a seleção de híbridos resistentes.

2 Estado da arte

2.1 A cultura do milheto granífero

O *Pennisetum glaucum*, milheto granífero, é originário do Oeste Africano, mas a Índia é o maior produtor mundial. Apesar de ser o sexto cereal mais produzido no mundo, o milheto é nutricionalmente superior ao trigo, arroz, milho e sorgo (Oumar et. al. 2008; ICAR. 2021). O milheto faz parte de um grupo denominado “*millets*”, no qual os membros possuem características em comum como a morfologia da inflorescência e das folhas, porém algumas espécies dentro deste grupo são consideradas plantas selvagens ou daninhas, que crescem espontaneamente, sem a interferência do homem, são plantas menores e que cruzam entre si formando novos genótipos (Brunken et al. 1977).

Os principais integrantes do grupo dos “*millets*” são *Setaria italica* (foxtail millet), *Eleusine carocana* (finger millet) e *Panicum miliaceum* (proso millet). No mundo essas gramíneas são destinadas principalmente a alimentação humana, no preparo de mingau, farinhas para confecção de pães e bolos, e também para produção de bebidas sem álcool (Girgi e O’Kennedy 2007). Entre as plantas cultivadas deste grande grupo dos “*millets*”, destaca-se *Pennisetum glaucum*, conhecido por ser uma planta rústica que se adapta a condições adversas como a seca, tolera solos salinos, possui elevada capacidade fotossintética, entre outras características (Yadav e Rai 2013).

No Brasil o milheto é utilizado principalmente para alimentação animal, sendo consumido de forma direta, no pastejo dos animais nos piquetes, por meio do corte das plantas e distribuição no cocho, preparo da silagem ou pode ser fornecido como ingrediente da composição de ração animal (Bastos et al. 2002; Santos et al. 2017). Contudo, o milheto também é uma importante cultura quando se trata de sistema de plantio direto, é utilizado como planta de cobertura na entressafra, sendo benéfico para produção de palhada, e possui sistema radicular profundo mantendo os solos protegidos dos possíveis danos causados por erosão (Priesnitz et al. 2011; Marcelo et al. 2012). Não somente isto, a cultura também pode reduzir a densidade de algumas espécies de nematoides (MacGuidwin et al. 2012).

O uso do milheto para alimentação humana encontra-se em forte expansão no Brasil, devido a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa ter liberado o uso de milheto como ingrediente integral no preparo de diversos alimentos como massas e pães, por uso da farinha

integral (ANVISA 2021). Ainda existe a possibilidade do consumo sem muitos preparos, como opção existe a pipoca, grãos cozidos ou germinados. Essa expansão se deu a partir do trabalho de Dias-Martins et al. (2018) que trata a respeito dos benefícios do cereal e também as possíveis formas de consumo do mesmo.

2.2 *Fusarium* associado à panícula de gramíneas

Espécies de *Fusarium* podem estar associadas a uma diversidade de gramíneas de importância econômica, como o milho, sorgo, arroz, trigo e cevada (Chala et al. 2014; Jurjevic et al. 2005; Beccari et al. 2018; Nicolli et al. 2020; Spanic et al. 2020). Nessa associação, a doença documentada é a podridão ou mofo, da panícula ou espiga, que compromete a qualidade do grão e potencialmente produz micotoxina (Wilson et al. 2006). No grupo dos “*millets*” já foi relatada a colonização por várias espécies de *Fusarium* no Leste Asiático, Estados Unidos e África (Choi et al. 2021; Vismar et al. 2019; Jurjevic et al. 2005) em *Pennisetum glaucum*, *Pennisetum typhoides*, *Panicum miliaceum*, *Setaria itálica* e *Eleusine carocana* também acontece (Onyike e Nelson 1991; Chala et al. 2014).

Os complexos de *Fusarium* que já foram relatados em associação com os “*millets*” são *Fusarium incarnatum-equiseti*, *F. fujikuroi*, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. tricinctum* e *F. burgessii* (Onyike e Nelson 1991; Beccari et al. 2018; Nor et al. 2019; Choi et al. 2021). Espécies desses complexos são conhecidas por produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por fungos, e sua produção depende de condições ambientais favoráveis (Stepien et al. 2019; Desjardins e Proctor 2007). Entende-se que as micotoxinas mais prejudiciais à saúde humana e animal está dentro dos tricotecenos, fumonisinas e zearalenona (Antonissen et al. 2014).

O tricoteceno é um grupo de toxinas que abrange uma série de compostos, entre eles, diacetoxiscirpenol, toxina T-2, nivalenol, e desoxinivalenol são os mais comumente encontrados em panículas de gramíneas (Desjardins e Proctor 2007). O complexo de espécies *F. incarnatum-equiseti* é um dos produtores de tricotecenos e zearalenona (Ávila et al. 2019; Villani et al. 2016). Os membros do complexo *F. fujikuroi* principalmente *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. fujikuroi* são conhecidos por produzir fumonisinas do tipo FB1, FB2 e FB3 (Rheeder et al. 2002; Nicolli et al. 2020). O efeito da toxina zearalenona, causando distúrbios no trato reprodutivo de animais, principalmente suínos, após ingestão, é bem documentado (Desjardins e Proctor 2007; Rai et al. 2019).

2.3 *Fusarium* associado ao colmo de gramíneas

Espécies de *Fusarium* causam podridão do colmo em muitas gramíneas como milho e sorgo, mas também no milheto (Bandara et al. 2019; Kim et al. 2018; Wilson 2002). A doença é caracterizada por escurecimento avermelhado a necrótico no interior do colmo, especificamente nos vasos condutores. Em condições mais severas, os tecidos do caule são desintegrados podendo levar ao acamamento da planta (Lal e Singh 1984). No grupo dos “millets”, somente o *Pennisetum glaucum* já foi relatado com podridão do colmo na Geórgia, EUA (Wilson 2002).

Comumente, as espécies isoladas a partir da lesão no colmo são pertencentes ao complexo *F. fujikuroi* (Bandara et al. 2019). Dentro do complexo FFSC, *F. verticillioides* é conhecido por induzir a podridão do colmo em milho (Naz et al. 2021), enquanto *F. madaense* induz podridão em milho e também em outras gramíneas como sorgo e o milheto (Costa et al. 2022). *Fusarium thapsinum* e *F. andiyazi* induzem a podridão em sorgo (Marasas et al. 2001). No entanto, além da colonização de FFSC em colmos de gramíneas, já houve o indício do morfotipo *F. semitectum* sendo isolado de colmos de *Pennisetum glaucum*, espécie de fungo pertencente ao complexo *F. incarnatum-equiseti*, porém, este é o único relato até então (Wilson 2002).

O complexo de espécies *F. incarnatum-equiseti* é conhecido por ser oportunista, patógeno humano, saprófita (Jurado et al. 2005; O'Donnell et al. 2009). Mas, no Brasil espécies do complexo *F. incarnatum-equiseti* já foram relatadas em associação com gramíneas forrageiras *Brachiaria* e *Panicum* provenientes dos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Costa et al. 2021). A etiologia da podridão do colmo do milheto não foi investigada ainda no Brasil. Essa informação é importante para a elaboração de estratégias de manejo e seleção de plantas resistentes em programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS

- Antonissen G, Martel A, Pasmans F, Ducatelle R, Verbrugghe E, Vandebroucke V, Li S, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Croubels S (2014) The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins* 28:430-452
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2021) Obtido de: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>
- Araújo MBM, Moreira GM, Nascimento LV, Nogueira GA, Nascimento SRC, Pfenning LH, Ambrósio MMQ (2020) *Fusarium* rot of melon is caused by several *Fusarium* species. *Plant Pathology* 70:712-721
- ATTO Sementes (2022) obtido de: <https://www.attosementes.com.br>
- Ávila CF, Moreira GM, Nicolli CP, Gomes LR, Abreu LM, Pfenning LH, Haidukowski M, Moretti A, Logrieco A, Ponte EMD (2019) *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with Brazilian rice: Phylogeny, morphology and toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology* 306:108267
- Bandara AY, Weerasooriya DK, Tesso TT, Little CR (2019) Stalk rot resistant sorghum genotypes are resilient to pathogen-mediated photosystem II quantum yield retardation. *Crop Protection* 124:104852
- Bastos AO, Landell Filho LC, Passipier M, Bastos JFP (2002) Diferentes níveis de grãos de milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Brown) na alimentação de suínos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31:1753-1760
- Beccari G, Senatore MT, Tini F, Sulyok M, Covarelli L (2018) Fungal community, *Fusarium* head blight complex and secondary metabolites associated with malting barley grains harvested in Umbria, central Italy. *International Journal of Food Microbiology* 273:33-42
- Brunken J, Wet JMJ, Harlan JR (1977) The Morphology and Domestication of Pearl Millet. *Economic Botany* 31:163-174
- Chala A, Degefu T, Brurberg MB (2019) Phylogenetically diverse *Fusarium* species associated with sorghum (*Sorghum bicolor* L). *Diversity* 11:1-11
- Chala A, Taye W, Ayalew A, Krska R, Sulyok M, Logrieco A (2014) Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Garten) from Ethiopia. *Food Control* 45:29-35
- Choi JH, Nah JY, Lee MJ, Jang JY, Lee T, Kim J (2021) *Fusarium* diversity and mycotoxin occurrence in proso millet in Korea. *Food Science and Technology* 141:110964
- Corrêa JC, Sharma RD (2004) Produtividade do algodoeiro herbáceo em plantio direto no Cerrado com rotação de culturas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:41-46

Costa MM, Maruzanete PM, Carmo FS, Moreira GM, Guimarães EA, Rocha FS, Costa SS, Abreu LM, Pfenning LH (2021) *Fusarium* species from tropical grasses in Brazil and description of two new taxa. *Mycological Progress* 20:61-72

Costa MM, Saleh AA, Melo MP, Guimarães EA, Esele JP, Zeller KA, Summerell BA, Pfenning LH, Leslie JF (2022) *Fusarium mirum* sp. nov, intertwining *Fusarium madaense* and *Fusarium andiyazi*, pathogens of tropical grasses. *Fungal Biology* 126:250-266

Desjardins AE, Proctor RH (2007) Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119:47-50

Dias-Martins AM, Pessanha KL, Pacheco S, Rodrigues JAS, Carvalho CWP (2018) Potential use of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) in Brazil: food security, processing, health benefits and nutritional products. *Food Research International* 109:175-186

Girgi M, O’Kennedy MM (2007) Pearl Millet. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 59:119-127

Houissa H, Lasram S, Sulyok M, Sarkanj B, Fontana A, Strub C, Krska R, Schorr-Galindo S, Ghorbel A (2019) Multimycotoxin LC-MS/MS analysis in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) from Tunisia. *Food Control* 106:106738

ICAR – All India Coordinated Research Project (2021) Obtido de: <http://www.aicrp.icar.gov.in/pearl>

Jurado M, Vázquez C, Patiño B, González-Jaén MT (2005) PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* 28:562-568

Jurjevic Z, Wilson JP, Wilson DM, Casper HH (2007) Changes in fungi and mycotoxins in pearl millet under controlled storage conditions. *Mycopathologia* 164:229-239

Kaurav A, Pandya RK, SINGH B (2018) Performance of botanicals and fungicides against blast of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Annals of Plant and Soil Research* 20:258-262

Kim MS, Zhang H, Yan H, Yoon BJ, Shim WB (2018) Characterizing co-expression networks underpinning maize stalk rot virulence in *Fusarium verticillioides* through computational subnetwork module analyses. *Scientific Reports* 8:8310

Lal S, Singh IS (1984) Breeding for resistance to downy mildews and stalk rots in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 69:111-119

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

- MacGuidwin AE, Knuteson DL, Connell T, Bland WL, Bartelt KD (2012) Manipulating Inoculum Densities of *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans* with Green Manure Amendments and Solarization Influence Potato Yield. *Phytopathology* 102:519-527
- Marasas WFO, Rheeder JP, Lamprecht SC, Zeller KA, Leslie JF (2001) *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia* 93:1203-1210
- Marcelo AV, Corá JE, Fernandes C (2012) Sequências de Culturas em Sistema de Semeadura Direta. I – Produção de Matéria Seca e Acúmulo de Nutrientes. *R. Bras. Ci. Solo* 36:1553-1567
- Naz R., Bano A, Nosheen A, Yasmin H, Keyani R, Shah STA, Anwar Z, Roberts TH (2021) Induction of defense-related enzymes and enhanced disease resistance in maize against *Fusarium verticillioides* by seed treatment with Jacaranda mimosifolia formulations. *Scientific Reports* 11:1-15
- Nicolli CP, Haidukowski M, Susca A, Gomes LB, Logrieco A, Stea G, Del Ponte EM, Moretti A, Pfenning LH (2020) *Fusarium fujikuroi* species complex in Brazilian rice: Unveiling increased phylogenetic diversity and toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology* 330:108667
- Nor NMI, Salleh B, Leslie JF (2019) *Fusarium* species from sorghum in Thailand. *Plant Pathology Journal* 35:301-312
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM (2009) Novel Multilocus Sequence Typing Scheme Reveals High Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium incarnatum-equiseti* and *F. chlamydosporum* Species Complexes within the United States. *J.C.Lin. Microbiol* 47:3851-3861
- Onyike NBN, Nelson PE, Marasas WFO (1991) *Fusarium* species associated with millet grains from Nigeria, Lesotho and Zimbabwe. *Mycologia* 83:708-712
- Oumar I, Mariac C, Pham JL, Vigouroux Y (2008) Phylogeny and origin of pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br) as revealed by microsatellite loci. *Theor Appl Genet* 117:489-497
- Priesnitz R, Costa ACT, Jandrey PE, Fréz JRS, Júnior JBD, Oliveira PSR (2011) Espaçamento entre linhas na produtividade de biomassa e de grãos em genótipos de milho pérola. *Ciências Agrárias* 32:485-494
- Proctor RH, McCormick SP, Alexander NJ, Desjardins AE (2009) Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium*. *Molecular Microbiology* 74:1128–1142
- Rai A, Das M, Tripathi A (2019) Occurrence and toxicity of a *Fusarium* mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1040-8398
- Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF (2002) Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 2101-2105

Santos R, Neves AL, Pereira LG, Verneque R, Costa CT, Tabosa J, Scherer C, Gonçalves L (2017) Divergence in agronomic traits and performance of pearl millet cultivars in Brazilian semiarid region. *Japanese Society of Grassland Science* 63:118-127

Spanic V, Katanic Z, Sulyok M, Krska R, Puskas K, Vida G, Drezner G, Sarkanj B (2020) Multiple Fungal Metabolites Including Mycotoxins in Naturally Infected and *Fusarium*-Inoculated Wheat Samples. *Microorganisms* 8:578

Stepien L, Kanczugowska L, Witaszak N, Urbaniak M (2019) *Fusarium* Secondary Metabolism Biosynthetic Pathways: So Close but So Far Away. *Co-Evolution of Secondary Metabolites* 211-247

Villani A, Moretti A, Saeger S, Han Zheng, Mavungu JDD, Soares CMG, Proctor RH, Venâncio A, Lima N, Stea G, Paciolla C, Logrieco AF, Susca A (2016) A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *International Journal of Food Microbiology* 234:24-35

Vismer HF, Shephard GS, Westhuizen LVD, Mngqawa P, Bushula-Njah V, Leslie JF (2019) Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains in vitro. *International Journal of Food Microbiology* 296:31-36

Wilson JP (2002) Fungi associated with the stalk rot complex of pearl millet. *Plant Disease* 86:833-839

Wilson JP, Jurjevic Z, Hanna WW, Wilson DM, Potter TL, Coy AE (2006) Host-specific variation in infection by toxigenic fungi and contamination by mycotoxins in pearl millet and corn. *Mycopathologia* 161:101–107

Yadav OP, Rai KN (2013) Genetic Improvement of Pearl Millet in India. *Agricultural Research* 2:275-292

Capítulo 2

Espécies de *Fusarium* associadas ao milheto granífero

Ana Caroline de Sousa Barros, Janaina M. Sousa, Ana Carolina Silva Galdino, João Victor Rodrigues Corso, Marileide M. Costa, Gláucia M. Moreira, Ludwig H. Pfenning.
Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-900, Lavras MG, Brazil

*Autor para correspondência: Ludwig H. Pfenning, e-mail: ludwig@ufla.br

Manuscrito preparado de acordo com as normas da revista *Tropical Plant Pathology*

RESUMO

O milheto granífero é uma cultura importante nas regiões áridas e semiáridas pois é uma planta rústica, possui boa adaptabilidade a seca e desenvolve em solos com baixa fertilidade. O destino do cereal é para alimentação animal, humana e é muito utilizado como cobertura morta no sistema plantio direto. Entre os fungos que ocorrem em associação com a cultura, são espécies de *Fusarium* que podem causar doença ou comprometer a qualidade e segurança dos grãos. A literatura primária sobre a associação milheto – *Fusarium* é escassa, enquanto ocorreu considerável expansão da cultura no Brasil em tempo recente. Nesse estudo, foi investigado quais espécies de *Fusarium* estão associadas ao milheto granífero no Brasil, quais espécies induzem o mofo da panícula e a podridão do colmo. Cerca de 160 isolados, obtidos de panículas e colmos com e sem sintomas ou sinais, provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil, foram caracterizados por meio de avaliação de seus marcadores morfológicos, análise de filogenia molecular de sequências da região gênica *tef1*, teste de patogenicidade e bioensaio. Foi possível identificar 13 diferentes espécies de *Fusarium*, que pertencem a dois complexos distintos. *Fusarium neosemitectum* e outras espécies do *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex FIESC induzem mofo da panícula no milheto. As espécies de *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC podem eventualmente produzir micotoxinas e não induzir o sinal do mofo, enquanto que espécies de FFSC e FIESC podem induzir podridão do colmo. A partir do conhecimento obtido é possível identificar e monitorar os agentes etiológicos, desenvolver estratégias para mitigar o possível dano e contribuir para o manejo fitossanitário. Será possível subsidiar programas de melhoramento que visam a seleção de híbridos resistentes.

Palavras-chave: *Pennisetum glaucum*, Doença de planta, filogenia molecular, mofo da panícula, podridão do colmo.

ABSTRACT

Grain millet is an important crop in arid and semi-arid regions, as it is a rustic plant that is resistant to drought and grows in soils with low fertility. The destination of the cereal is for animal and human food. Among the fungi that occur in association with the crop are *Fusarium* species that can cause disease or compromise the quality and safety of grains. The primary literature about the association millet-*Fusarium* is scarce, while there has been considerable expansion of the culture in Brazil in recent times. In this study, it was investigated which *Fusarium* species are associated with grain millet in Brazil, which species induce head mold and stem rot. About 160 isolates, obtained from panicles and stems with and without symptoms or signs, from different producing regions of Brazil, were characterized by evaluating their morphological markers, analysis of molecular phylogeny of sequences from the *tef1* gene region, pathogenicity test and bioassay. It was possible to identify 13 different species of *Fusarium*, which belong to two distinct complexes. *Fusarium neosemitectum* and other species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex FIESC induce head mold in millet. Species of the *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC may eventually produce mycotoxins and not induce the mold signal, while species of the FFSC and FIESC can induce stem rot. Based on the knowledge obtained, it is possible to identify and monitor the etiological agents, develop strategies to mitigate possible damage and contribute to phytosanitary management. It will also be possible to subsidize breeding programs aimed at selecting resistant hybrids.

Key Words: *Pennisetum glaucum*, head mould, molecular phylogeny, plant disease, stem rot.

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1. Porcentuais de ocorrência de espécies de *Fusarium* obtidos na avaliação de *blotter test*.

Tabela 2. Isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* FIESC, obtidos de panículas de *Pennisetum glaucum*. Em negrito, isolados obtidos por isolamento direto.

^a ACB: Ana Caroline de Sousa Barros, CM: Caroline Marchi; ^b Sinal de mofo na panícula: C/S: com sinal, S/S: sem sinal; ^c Estados brasileiros: BA: Bahia, GO: Goiás, MT: Mato Grosso, PA: Pará, TO: Tocantins, PA: Pará.

Tabela 3. Isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC, obtidos de panículas de *Pennisetum glaucum*.

^a ACB: Ana Caroline de Sousa Barros, CM: Caroline Marchi; ^b Sinal de mofo na panícula: C/S: com sinal, S/S: sem sinal; ^c Estados brasileiros: BA: Bahia, GO: Goiás, MT: Mato Grosso, TO: Tocantins.

Tabela 4. Isolados do complexo *Fusarium chlamydosporum* FCSC, obtidos de panículas de *Pennisetum glaucum*.

^a ACB: Ana Caroline de Sousa Barros, CM: Caroline Marchi; ^b Sinal de mofo na panícula: C/S: com sinal, S/S: sem sinal; ^c Estados brasileiros: GO: Goiás, MT: Mato Grosso, PA: Pará, TO: Tocantins.

Tabela 5. Isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* FIESC, obtidos de colmos de *Pennisetum glaucum* com sintomas de podridão.

^a ACB: Ana Caroline de Sousa Barros, CM: Caroline Marchi; ^b Estados brasileiros: BA: Bahia, GO: Goiás, MT: Mato Grosso, MS: Mato Grosso do Sul.

Tabela 6. Isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC, obtidos de colmos de *Pennisetum glaucum* com sintomas de podridão.

^a ACB: Ana Caroline de Sousa Barros, CM: Caroline Marchi;

^b Estados brasileiros: BA: Bahia, MT: Mato Grosso, MS: Mato Grosso do Sul.

Figura 1. Árvore filogenética de máxima parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos do gene *EF-1 α* mostrando a relação de *Fusarium* associada ao mofo da panícula e podridão do colmo com outras espécies dentro do *Fusarium incarnatum-equiseti species complex* FIESC. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) de MP $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex-epítipo são indicados com T e ET, respectivamente.

Figura 2. Árvore filogenética de máxima parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos do gene *EF-1 α* mostrando a relação de *Fusarium* associada ao mofo da panícula e podridão do colmo com outras espécies dentro do *Fusarium fujikuroi species complex* FFSC. Os valores de

bootstrap (1000 réplicas) de $MP \geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex-epítipo são indicados com T e ET, respectivamente.

Figura 3. *Fusarium neosemitectum*. **A-B.** Colônias em BDA; **A.** superfície da colônia; **B.** verso da colônia; **C-G.** Fotomicrografias de estruturas reprodutivas; **C.** macroconídios no micélio aéreo; **D-E.** polifiálides; **F-G.** macroconídios formados no micélio aéreo.

Figura 4. Panículas de milho ADRG 9060 inoculadas com espécies de *Fusarium*. **A.** tratamento controle, sem sinal de mofo. **B.** panícula inoculada com *F. neosemitectum*, com sinal de mofo. **C.** panícula inoculada com *F. caatingaense*, com sinal de mofo. **D.** panícula inoculada com *F. sulawesiense*, com sinal de mofo. **E.** panícula inoculada com *F. brachiariae*, sem sinal de mofo.

Figura 5. Colmos de milho ADRG 9070 inoculadas com espécies de *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC e *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex FIESC. **A-B.** tratamento controle perfurado com palito estéril; **C-D.** colmo inoculado com *F. madaense*; **E-F.** colmo inoculado com *F. brachiariae*; **G-H.** colmo inoculado com *F. hainanense*; **I-J.** colmo inoculado com espécie representante de “FIESC sp.”.

Figura 6. Severidade da podridão do colmo em milho, induzida por espécies de *Fusarium*. Os dados são notas relacionadas com a porcentagem do entrenó com sintomas da doença.

INTRODUÇÃO

A cultura do milheto granífero (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.) é milenar nas regiões áridas e semiáridas dos continentes Asiático e Africano devido à sua rusticidade, resistência à seca e tolerância a solos com baixa fertilidade. Nessas partes do mundo, o grão se destina à alimentação humana e animal (Yadav e Rai 2013). Outras espécies que compõem o grupo dos milhetos ou “millets” são *Setaria italica* (foxtail millet), *Eleusine carocana* (finger millet) e *Panicum miliaceum* (proso millet). A expansão da cultura do milheto granífero no território brasileiro se deu mais recentemente e atualmente já ocupa uma área plantada de 500.000 hectares por ano (ATTO 2022). O grão se destina à alimentação de animais como ingrediente de ração ou como silagem, mas também é utilizado como cobertura do solo no sistema plantio direto (Bastos et al. 2002; Santos et al. 2017). Neste sistema, o milheto tem resultados positivos, como por exemplo a supressão da densidade e da diversidade de plantas daninhas (Araújo et al. 2021). Além de oferecer excelente opção para a rotação de cultura, elevando o potencial produtivo de grandes culturas do Cerrado (Corrêa e Sharma 2004). Recentemente o seu uso na alimentação humana foi regulamentado no Brasil com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 493/2021 na qual foi autorizado o uso do milheto como ingrediente para produzir diversos produtos alimentícios, tais como biscoitos e massas (ANVISA 2021). Os benefícios do uso de milheto na fabricação de produtos alimentícios e na alimentação humana foi instruído a partir do trabalho de Dias-Martins et al. (2018).

Entre os desafios para alcançar boa produtividade e qualidade do milheto, coloca-se o manejo fitossanitário. Vários fungos foram registrados em associação com o milheto, que requerem controle e manejo. Doenças foliares economicamente relevantes são causadas por *Bipolaris setariae* (mancha foliar), *Pyricularia grisea* (brusone), *Puccinia substriata* (ferrugem) e *Sclerospora graminicola* (míldio). Como doenças fúngicas secundárias são consideradas a mancha foliar causada por *Cercospora penniseti*, ergot ou mela causado por *Claviceps fusiformis* e o carvão *Tolyposporium penicillariae* (Kaurav et al. 2018). Por se tratar de cultura em expansão, a ocorrência e a frequência dessas doenças em plantações Brasileiras ainda precisam ser avaliadas. Não existe literatura primária disponível.

Assim como em outras gramíneas, existe elevada diversidade de espécies de *Fusarium* em associação com o milheto, como patógeno, endófito, saprófita na panícula ou potencial produtor de micotoxinas. Uma das doenças documentadas é a podridão do colmo e da panícula (Oniyke 1991; Wilson 2002). Várias espécies de *Fusarium*, que pertencem principalmente aos complexos *Fusarium fujikuroi* FFSC e *Fusarium incarnatum-equiseti* FIESC colonizam a

panícula e os grãos de gramíneas, onde podem causar podridão e mofo (Houissa et al. 2019; Leslie et al. 2005; Vismer et al. 2019; Wilson et al. 2006). As espécies de *Fusarium* são conhecidas por produzir diversas micotoxinas, metabólitos secundários altamente tóxicos a vertebrados, que podem acumular no organismo, mesmo quando ingeridos em quantidades muito baixas (Leslie et al. 2005; Proctor et al. 2009; Villani et al. 2016).

As principais micotoxinas produzidas por *Fusarium* são fumonisinas, tricotecenos e zearalelona. A ocorrência de uma espécie potencialmente micotoxigênica em grãos é sempre um alerta sobre uma possível contaminação do produto e seus derivados. Um estudo realizado na Etiópia evidenciou que a micotoxina zearalenona prevaleceu em maiores concentrações nas amostras de sorgo e finger millet (Chala et al. 2014). Em associação com o grupo dos millets ocorre aparentemente grande diversidade de espécies de *Fusarium* dos complexos FFSC e FIESC, mas que não foram identificadas (Chala et al. 2019). Em proso millet na Coreia foram encontradas as toxinas zearalenona, deoxinivalenol e nivalenol (Choi et al. 2021). Na fase pós-colheita, as condições adequadas de armazenamento do milho granífero em baixo teor de umidade, são decisivas para evitar a contaminação por zearalenona e outras micotoxinas (Jurjevic et al. 2007). Essa toxina tem a capacidade de causar danos ao sistema reprodutivo de animais (Rai et al. 2019). Portanto, considerando o destino do milho granífero à alimentação humana e animal, a qualidade e segurança dos grãos requer atenção especial.

Esse estudo tem por objetivo responder as seguintes questões: i. quais espécies de *Fusarium* podem ser encontradas em associação com o milho granífero no Brasil? ii. quais espécies causam mofo da panícula? iii. quais espécies de *Fusarium* em associação com a panícula podem produzir micotoxinas? iv. quais espécies causam a podridão do colmo? A partir do conhecimento obtido é possível desenvolver estratégias para mitigar o possível dano e contribuir para o manejo fitossanitário. Será possível, ainda, subsidiar programas de melhoramento que visam a seleção de híbridos resistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento, cultivo monospórico e preservação dos isolados

Os isolados foram obtidos a partir de amostras de colmos e panículas, com e sem sintomas ou sinais de *Fusarium*. As amostras eram provenientes de áreas de produção de milho granífero dos estados Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Tocantins, Goiás e Pará. A partir do colmo foi realizado isolamento indireto de fungos, no qual as amostras com

sintomas de podridão foram lavadas em água corrente e os fragmentos de 5-10 mm foram colocados em placas contendo meio extrato de malte 2% (MA2%) com antibiótico estreptomicina (AB) e incubados na bancada, em temperatura ambiente. Quando observado o crescimento de colônias indicativas de *Fusarium*, estruturas do fungo foram transferidas para placas de poliestireno de 60 mm, contendo meio MA2%, para obter culturas puras.

A partir das panículas com sinal de *Fusarium* foi usado o método do isolamento direto, com transferência do micélio presente na superfície do grão para meio de cultura e também isolamento indireto no qual os grãos foram submetidas ao *blotter test*. Nas panículas sem sinal de *Fusarium*, foi realizado somente *blotter test*. Os grãos submetidos ao *blotter test* foram desinfestados superficialmente com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1% e dispostos em gerbox (10 x 10 cm, 50 grãos por recipiente) sobre três folhas de papel filtro, umedecidos com solução salina 1%. Os recipientes foram mantidos em bancada sob temperatura e fotoperíodo ambiente. Os grãos foram analisados diariamente com o auxílio de um microscópio estereoscópio e colônias indicativas de *Fusarium* foram transferidas para placas contendo meio de cultura MA2%. Os isolados obtidos foram preservados como culturas monospóricas em água destilada e esterilizada, sob temperatura de 10°C no escuro e criopreservados em 15% de glicerol e -80°C, na Coleção Micológica de Lavras (CML).

Caracterização morfológica e determinação de morfotipos

Características morfológicas como tipo de fiálide, formato de conídios, presença ou não de clamidósporos foram avaliadas e utilizadas como critérios para definição de morfotipos (Leslie & Summerell 2006, O'Donnell et al. 2009). As avaliações das características morfológicas foram realizadas nos isolados cultivados em meio bata-dextrose-ágar (BDA) incubados em câmara tipo BOD sob temperatura de 25 °C por 4 dias no escuro para avaliação da taxa de crescimento das colônias (Leslie e Summerell 2006).

Para avaliara morfologia foram utilizados os protocolos de Leslie e Summerell (2006). As características micromorfológicas foram avaliadas em meio SNA com folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) para induzir a esporulação. Estes foram incubados em câmara BOD sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, por cerca de 10 a 15 dias nos quais as dimensões dos conídios produzidos no micélio aéreo e esporodóquio foram medidas, bem como a observação de seu formato e septação. As características dos conidióforos e a produção de clamidósporos também foram observadas.

Extração de DNA, PCR, sequenciamento e análise filogenética

Os fungos foram cultivados em meio líquido de extrato de malte 2% durante 3 a 5 dias, temperatura de 25 a 28°C e mantidos no agitador de mesa orbital sob agitação de 100 rpm. Em seguida o micélio foi filtrado e macerado em nitrogênio líquido para o rompimento da parede celular. A extração seguiu protocolo básico utilizando CTAB (O'Donnell 1992). Para verificar a quantificação de DNA da extração, as amostras foram observadas em aparelho NanoDrop 2000 e o produto da extração visualizado em gel de agarose 1,2%.

O fragmento do genoma amplificado foi fator de elongação 1- α (EF-1 α). Para o gene EF-1 α , foram utilizados os primers Ef-3 e Ef-22 (O'Donnell et al. 1998). As reações de PCR foram realizadas no aparelho termociclador MyCycler™ (BIO-RAD). As condições de ciclo para EF-1 α foram: 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94°C, por 30 segundos; 62°C, por 45 segundos; 72°C, por 1 minuto e 72°C, por 5 minutos (O'Donnell et al. 1998). Ao final, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed (Biotium®) para verificar o tamanho do fragmento amplificado e posteriormente visualizados em um fotodocumentador da marca DNR Bio Imaging Systems e modelo MiniBIS. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o PCR Products Purification Kit (Ludwig Biotecnologia) para, posteriormente, serem sequenciados.

Os fragmentos amplificados foram sequenciados nos sentidos senso e antisenso pelo laboratório da Psomagen (USA). Os eletroferogramas foram gerados e analisados com o programa SeqAssem® (Hepperle 2004) e as sequências obtidas foram comparadas utilizando-se dados do GenBank do National Center for Biotechnological Information (NCBI) com auxílio da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências de referência de membros pertencentes aos complexos FIESC e FFSC, correspondentes às regiões sequenciadas também foram acrescentadas às análises. Os alinhamentos das sequências foram gerados com auxílio da ferramenta CLUSTALW (Thompson et al. 1994) e implementada no programa MEGAX (Kumar et al. 2018). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o método de Máxima Máxima Parcimônia, também no programa MEGAX.

Bioensaio da panícula

A inoculação foi realizada em panículas de milho híbrido ADRG 9060. Para o bioensaio da panícula, sementes de milho foram semeadas em 5 vasos de 5 L contendo solo, areia e substrato Carolina soil (1:1:1) e mantidas em casa vegetação. O delineamento

experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições de uma planta cada. Cada tratamento consistiu em um isolado representante de uma espécie identificada, totalizando 6 espécies, mais o tratamento controle. A obtenção do inóculo consistiu no cultivo dos isolados em placas de Petri contendo meio extrato de malte 2%, sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz fluorescente (Leslie & Summerell 2006). A suspensão de esporos foi preparada pela adição de água destilada (10 mL) nas placas, e em seguida a amostra foi filtrada em duas camadas de gaze com objetivo de separar fragmentos de micélio. Por fim, a concentração da suspensão de conídios foi ajustada em câmara de Neubauer, para de 1×10^6 conídios mL⁻¹.

No procedimento de inoculação das panículas, foram borrifados 25 mL de suspensão de esporos no estágio de desenvolvimento 5 (ED 5), quando as mesmas já apresentavam o estigma emitido (Clements & Kleinschmidt 2003). Para não haver deriva do inóculo foram utilizados sacos plásticos, cobrindo a panícula durante todo o processo, sendo mantidos na planta por cerca de 15 horas após a inoculação como câmara úmida. As plantas controle foram tratadas apenas com água destilada. Ao final do ciclo da cultura as panículas foram coletadas e avaliadas visualmente quanto a presença ou não de mofo, em seguida, foi realizada a quantificação da incidência da espécie inoculada, no *blotter*. Cada tratamento foi submetido ao *blotter test* com 100 grãos, sendo 4 repetições de 25 grãos cada (Michail 1985). Primeiramente os grãos foram desinfestados com álcool 70% e hipoclorito 1%, na sequência foram lavados com água esterilizada e distribuídos em placas contendo três folhas de papel de filtro embebidas em solução salina 1%. As amostras foram mantidas em bancada sob temperatura ambiente. Ao final do bioensaio foi feito o reisolamento para verificar se os isolados obtidos correspondem aos mesmos inoculados, de acordo com os postulados de Koch (Koch 1890).

Teste de patogenicidade do colmo

A inoculação foi realizada em colmos de milho híbrido ADRG 9070. Para o teste em colmo, palitos foram cortados com aproximadamente 2 cm, esterilizados e acondicionados junto ao fungo em placas de Petri contendo meio extrato de malte 2%. Fragmentos do fungo foram deslizados próximo aos palitos e mantido sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas durante 15 dias. As sementes de milho granífero foram semeadas em campo seguindo o delineamento experimental de blocos casualizados, com 5 plantas por parcela em 3 blocos.

Os colmos foram inoculados quando apresentaram o terceiro entrenó expandido, no ED 4. Primeiramente o colmo foi desinfestado superficialmente com álcool 70% e então foi

submetido a um ferimento com auxílio de um escupidor helleback (material de uso odontológico), em seguida foi inserido o palito infestado que ficou mantido no colmo até o momento da avaliação que ocorreu 25 dias após a inoculação. As plantas controle foram inoculadas com palitos estéreis (Damicone et al. 1988). A avaliação da severidade da podridão do colmo do milho foi realizada com base na escala de notas proposta por Nicoli et al. (2015). Os colmos foram cortados verticalmente e o terceiro entrenó foi submetido a avaliação. A identificação da frequência dos morfotipos de *Fusarium* foi avaliada com base na morfologia descrita por Leslie & Summerell (2006). Ao final do teste de patogenicidade, foi feito o reisolamento para verificar se os isolados obtidos correspondem aos mesmos inoculados, de acordo com postulados de Koch (Koch 1890).

Análise estatística

Os dados gerados a partir da quantificação da incidência da espécie inoculada no *blotter* e os dados gerados do teste de patogenicidade do colmo, foram submetidos à análise de variância e as variáveis significativas foram submetidas ao teste de médias de Tukey a 5% de significância. Os pressupostos da normalidade e homogeneidade foram avaliados por meio dos testes de Shapiro Wilk e Bartlett, respectivamente, não havendo transformação dos dados quando os mesmos não atendiam aos pressupostos.

RESULTADOS

Identificação dos isolados, caracterização morfológica e determinação de morfotipos

De 41 amostras recebidas em 2021 foi obtido um total de 167 isolados, em que 67 foram isolados de panículas e 31 isolados de colmos (Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5). Desses, 65, a maioria, pertencem ao complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* FIESC, enquanto 33 ao complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC. Contudo, existe um total de 69 isolados dos complexos FIESC (n=40), FFSC (n=17) e *Fusarium chlamydosporum* FCSC (n=7) que não foram sequenciados. Os isolados foram agrupados por morfotipo e uma subamostra foi selecionada para análise filogenética.

Análise filogenética

A análise da filogenia molecular baseada no gene *tefl* mostrou que 98 isolados (58,7%) foram representantes dos complexos FIESC e FFSC. Os isolados agruparam com sequências

de referência de *Fusarium sulawesiense* (n=28), *Fusarium caatingaense* (n=6), *Fusarium incarnatum* (n=4), *Fusarium hainanense* (n=14), *Fusarium compactum* (n=1), *Fusarium pernambucanum* (n=1), *Fusarium neosemitectum* (n=10), *Fusarium* sp. 1 (n=1) (Fig. 1) *Fusarium verticillioides* (n=19), *Fusarium brachiariae* (n=5), *Fusarium madaense* (n=6), *Fusarium gigantea* (n=1) e *Fusarium proliferatum* (n=2) (Fig. 2).

Avaliação de marcadores morfológicos

O isolado CM 03 que não agrupou com nenhuma espécie de referência de acordo com a análise filogenética (Fig. 1), foi observado e apresentou coloração de colônia variando de branca a bege. Em meio BDA e incubados a 25°C no escuro o crescimento micelial apresentou 1,66 cm de diâmetro por dia. Macroconídios formados no esporodóquio apresentaram de 1 a 5 septos, com 22,5-37,5 x 3,75 µm, com formato falcado, célula apical curvada e célula pé em forma de pé. Macroconídios formados no micélio aéreo a partir de polifiálides apresentaram de 1 a 5 septos, com 30-50 x 3,75 µm, com formato falcado, célula apical curvada e célula pé pouco desenvolvida. Em meio SNA com folha de cravo, foi observada produção de esporodóquio de coloração marrom clara. Clamidósforo ausente.

Bioensaio panícula

Baseado na análise filogenética do gene *EF-1α*, neste estudo, os isolados dos complexos FIESC e FFSC obtidos de panículas com e sem sinais de *Fusarium* em milho foram identificados como as seguintes espécies filogenéticas *F. sulawesiense*, *F. caatingaense*, *F. hainanense*, *F. pernambucanum*, *F. neosemitectum*, *Fusarium* sp. 1, *F. brachiariae* e *F. verticillioides*.

Panículas inoculadas com isolados de *Fusarium neosemitectum*, *F. sulawesiense* e *F. caatingaense* em casa de vegetação, apresentavam sinal de mofo 15 dias após inoculação, antes que os grãos chegassem no seu estágio de maturidade fisiológica. No estágio de maturação dos grãos, as panículas foram coletadas e avaliadas quanto a presença do mofo. O sinal de *F. neosemitectum* foi caracterizado por crescimento micelial na coloração rosada, textura pulverulenta e cobrindo quase toda panícula, isso ocorreu em 100% das panículas inoculadas. O isolamento dessa espécie na amostra recebida do campo, ocorreu de forma direta e os sinais observados através do bioensaio foram iguais aos observados na amostra. O sinal de *F. sulawesiense* apresentou coloração rosada, com presença de esporodóquio laranja e textura pulverulenta em 40% das panículas inoculadas. Semelhante a amostra que foi isolada essa

espécie, de forma direta. O sinal induzido por *F. caatingaense* apresentou coloração branca e textura pulverulenta em 60% das panículas inoculadas, porém esse isolado não foi obtido diretamente do sinal na panícula (Fig. 4).

As panículas inoculadas com as espécies de *Fusarium sp.1*, *F. brachiariae* e *F. verticillioides* não apresentaram sinal de mofo. Somente o *Fusarium sulawesiense* e *F. neosemitectum* foram obtidos através de isolamento direto do sinal na panícula, as demais espécies foram isoladas através do *blotter test*, de panículas com e sem sinais. Contudo, apesar de algumas não apresentarem sinal, todas as espécies inoculadas foram observadas no reisolamento realizado por *blotter test*. Nesse teste os percentuais de incidência da espécie inoculada variaram de 22 no tratamento controle e 100% no tratamento com *F. neosemitectum* (Tab. 6). As panículas do tratamento controle apresentaram sinais de coloração branca a rosada em 40% das panículas inoculadas e apresentaram baixa incidência de *Fusarium sp.* no *blotter test*.

Após verificar a homogeneidade e a normalidade dos tratamentos, foi realizado a ANOVA. Realizamos teste de Tukey a 5% de significância e observou-se que todos os isolados representantes das espécies testadas diferiram do controle quanto as porcentagens atribuídas no *blotter test*.

Tabela 1. Porcentuais de ocorrência de espécies de *Fusarium* obtidos na avaliação de *blotter test*.

Tratamentos	Porcentagem
<i>F. neosemitectum</i>	100 a
<i>F. sulawesiense</i>	84 b
<i>Fusarium sp. 1</i>	80 b
<i>F. brachiariae</i>	44 c
<i>F. verticillioides</i>	42 c
<i>F. caatingaense</i>	37 c
Controle	22 d
CV	7,5

Teste de patogenicidade do colmo

Baseado na análise filogenética do gene *EF-1 α* , neste estudo, os isolados dos complexos FIESC e FFSC obtidos de tecidos sintomáticos de colmos de milho foram identificados como as seguintes espécies filogenéticas *F. sulawesiense*, *F. compactum*, *F. incarnatum*, *F. hainanense*, *F. madaense*, *F. brachiariae*, *F. gigantea* e *F. proliferatum*. No teste de patogenicidade com o híbrido de milho ADRG 9070, os isolados representantes das espécies identificadas induziram sintomas de podridão do colmo (Fig. 5).

No campo, após 10 dias da inoculação, os colmos inoculados apresentaram lesões necróticas na parte externa do colmo do milho híbrido ADRG 9070. Com 25 dias da inoculação as espécies induziram sintomas de podridão, caracterizada por coloração marrom escuro a lesões necróticas no interior do colmo. As espécies *F. madaense* e *F. hainanense* foram isoladas de amostras de campo com sintomas de coloração avermelhada, já *F. brachiariae* foi isolado de amostra com lesões necróticas. No reisolamento dos tecidos infectados, foi observado a espécie inoculada fechando assim os postulados de Koch e confirmando sua patogenicidade. As plantas provenientes do tratamento controle não apresentaram sintomas de podridão do colmo.

Após verificar a homogeneidade e normalidade dos tratamentos foi realizada a ANOVA. Realizou-se análises não paramétricas com os testes Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$) pois não houve homogeneidade entre os dados, e observamos que a espécie de “FIESC sp.” diferiu estatisticamente do controle quanto as notas dadas no interior do colmo. As espécies *F. madaense* e *F. brachiariae* apresentaram as maiores médias em relação aos demais tratamentos. *Fusarium madaense*, *F. brachiariae* e *F. hainanense*, apesar de induzir lesões, não diferiram estatisticamente do controle. *Fusarium hainanense* e “FIESC sp.” foram menos virulentos em relação as demais espécies (Fig. 6).

DISCUSSÃO

As espécies retiradas de panículas já foram isoladas de outros hospedeiros. De acordo com a literatura *F. caatingaense* e *F. hainanense* já foram relatados em associação com grãos de arroz, no Brasil (Ávila et al. 2019; Santos et al. 2019). *Fusarium verticillioides* causa a podridão da espiga em milho (Naz et al. 2021). *Fusarium neosemitectum* é uma espécie pouco conhecida, foi isolada de plantas de bananeira, na República do Congo (Xia et al. 2019). *Fusarium pernambucanum* foi relatado também como patógeno de melão, induzindo sintomas de podridão em frutos (Zhang et al. 2022).

O presente estudo evidencia que espécies dos complexos FIESC e FFSC colonizam grãos de milho, porém somente as espécies pertencentes ao FIESC induzem o mofo da panícula. Isso pode ser explicado porque esse grupo de fungos é representado por patógenos oportunistas e saprófitas (Jurado et al. 2005; O'Donnell et al. 2009). Espécies do FFSC são bem conhecidos como patógenos de gramíneas, causando podridão do colmo e espiga de milho e sorgo, mas também como patógenos de fruteiras como mangueira e abacaxizeiro. (Dam e Rep 2017, Leslie 2008, Costa et al. 2022).

Todas as espécies inoculadas na panícula do milho, apresentaram nível de virulência maior quando comparadas com o controle, de acordo com a análise estatística gerada com os dados obtidos da avaliação do *blotter test*. As demais espécies não apresentaram diferenças quanto ao nível de virulência. As espécies de FIESC e FFSC aparentemente não induzem sintomas de doenças nas panículas, não diminuem rendimento, não afetam as características morfológicas da cultura e dos grãos, mas existe o risco de produção de micotoxinas.

As espécies retiradas de colmos já foram isoladas de outros hospedeiros. De acordo com a literatura *F. incarnatum* foi relatado como patógeno de pós colheita no melão, induzindo a podridão dos frutos (Araújo et al. 2020; Wonglom e Sunpapão 2020), *F. compactum* induz podridão de raízes em banana (Logrieco et al. 1994). *Fusarium madaense* e *F. proliferatum* induz podridão do colmo em milho, sorgo e milho (Leslie 2008, Costa et al. 2022). *Fusarium gigantea* foi descrito recentemente a partir de isolados endófitos de *Panicum maximum* (Maia et al. 2020).

Espécies do complexo FFSC podem ser encontradas com frequência em colmos sintomáticos de gramíneas (Naz et al. 2021). Neste trabalho, além de testarmos a patogenicidade de espécies do complexo FFSC, testamos também a patogenicidade de espécies de FIESC, pois essas espécies foram isoladas individualmente de colmos sintomáticos, foram submetidas ao teste de patogenicidade e reisoladas das plantas inoculadas. Considerando que FIESC ainda não é reconhecido como um fitopatógeno e para confirmar os resultados, torna-se necessário realizar nova metodologia para confirmara patogenicidade de isolados de FIESC (Jurado et al. 2005; O'Donnell et al. 2009).

Dentre as espécies inoculadas no colmo do milho, apenas “FIESC sp.” apresentou nível de virulência maior em comparação ao controle e as demais espécies de acordo com a análise estatística gerada com as notas de severidade atribuídas no interior do colmo. As demais espécies não apresentaram diferenças no nível de virulência. Isso sugere novamente que se teste outra metodologia para confirmar os níveis de severidade. *Fusarium sulawesiense* e *F. brachiariae* espécies dos complexos FIESC e FFSC foram comuns tanto no colmo como na panícula. De acordo com a literatura, *Fusarium sulawesiense* foi relatado como patógeno do melão, assim como *F. incarnatum*, ambos induzindo podridão dos frutos (Araújo et al. 2020; Wonglom e Sunpapão 2020), enquanto *F. brachiariae* foi encontrado a partir de amostras de sementes de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum* (Costa et al. 2021).

CONCLUSÃO

Fusarium neosemitectum é o principal agente causal de mofo em panículas de milho granífero. *Fusarium sulawesiense* e *F. caatingaense* representantes de FIESC, eventualmente podem induzir sinais de mofo. *Fusarium verticillioides* e *F. brachiariae*, representantes de FFSC não induzem sinais de mofo. Espécies do complexo FFSC e FIESC induzem sintomas de podridão do colmo em milho granífero. Como perspectiva futura, existe a necessidade de avaliar outra metodologia para testar a patogenicidade no colmo, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos nesse trabalho e avaliar se a metodologia do palito infestado é drástica às plantas, ao ponto de favorecer os sintomas induzidos por espécies de FIESC.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

REFERÊNCIAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2021) Obtido de: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>
- Araújo MBM, Moreira GM, Nascimento LV, Nogueira GA, Nascimento SRC, Pfenning LH, Ambrósio MMQ (2020) *Fusarium* rot of melon is caused by several *Fusarium* species. *Plant Pathology* 70:712-721
- ATTO Sementes (2022) obtido de: <https://www.attosementes.com.br>
- Ávila CF, Moreira GM, Nicolli CP, Gomes LR, Abreu LM, Pfenning LH, Haidukowski M, Moretti A, Logrieco A, Ponte EMD (2019) *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with Brazilian rice: Phylogeny, morphology and toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology* 306:108267
- Bastos AO, Landell Filho LC, Passipier M, Bastos JFP (2002) Diferentes níveis de grãos de milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Brown) na alimentação de suínos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31:1753-1760
- Chala A, Degefu T, Brurberg MB (2019) Phylogenetically diverse *Fusarium* species associated with sorghum (*Sorghum bicolor* L). *Diversity* 11:1-11
- Chala A, Taye W, Ayalew A, Krska R, Sulyok M, Logrieco A (2014) Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Garten) from Ethiopia. *Food Control* 45:29-35
- Choi JH, Nah JY, Lee MJ, Jang JY, Lee T, Kim J (2021) *Fusarium* diversity and mycotoxin occurrence in proso millet in Korea. *Food Science and Technology* 141:110964
- Clements MJ, Kleinschmidt CE (2003) Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. *Plant Disease* 87:147-153
- Corrêa JC, Sharma RD (2004) Produtividade do algodoeiro herbáceo em plantio direto no Cerrado com rotação de culturas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:41-46
- Costa MM, Maruzanete PM, Carmo FS, Moreira GM, Guimarães EA, Rocha FS, Costa SS, Abreu LM, Pfenning LH (2021) *Fusarium* species from tropical grasses in Brazil and description of two new taxa. *Mycological Progress* 20:61-72
- Costa MM, Saleh AA, Melo MP, Guimarães EA, Esole JP, Zeller KA, Summerell BA, Pfenning LH, Leslie JF (2022) *Fusarium mirum* sp. nov, intertwining *Fusarium madaense* and *Fusarium andiyazi*, pathogens of tropical grasses. *Fungal Biology* 126:250-266
- Dam PV, Rep M (2017) The Distribution of Miniature Impala Elements and SIX Genes in the *Fusarium* Genus is Suggestive of Horizontal Gene Transfer. *Journal of molecular evolution* 85:14-25
- Damicone PJ, Vineis PD, Manning WJ (1988) Cross-pathogenicity of *Fusarium moniliforme* isolates from corn and asparagus. *Plant Disease* 14:774-777

Hepperle D (2004) SeqAssem^a. Win32-Version. A Sequence Analysis Tool Contig Assembler and Trace Data Visualization Tool for Molecular Sequences Disponível em: <http://www.sequentix.de>

Houissa H, Lasram S, Sulyok M, Sarkanj B, Fontana A, Strub C, Krska R, Schorr-Galindo S, Ghorbel A (2019) Multimycotoxin LC-MS/MS analysis in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) from Tunisia. Food Control 106:106738

Jurado M, Vázquez C, Patiño B, González-Jaén MT (2005) PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. Systematic and Applied Microbiology 28:562-568

Jurjevic Z, Wilson JP, Wilson DM, Casper HH (2007) Changes in fungi and mycotoxins in pearl millet under controlled storage conditions. Mycopathologia 164:229-239

Kaurav A, Pandya RK, SINGH B (2018) Performance of botanicals and fungicides against blast of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). Annals of Plant and Soil Research 20:258-262

Koch R (1890) An address on bacteriological research. British medical journal 2:380-384

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549

Leslie JF (2008) *Sorghum and millets diseases*. John Wiley e Sons.

Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell Publishers

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

Logrieco FSA, Moretti A, Grammatikaki G, Bottalico A (1994) Banana corm and root rot by *Fusarium compactum*, in Crete. Phytopathologia Mediterranea 33:78-82

Maia NC, Melo MP, Guimarães SSC, Matos KS, Moreira SI, Lana UDP, Cardoso PG (2021). *Panicum maximum* as a reservoir of a potential maize pathogen. European Journal of Plant Pathology 159:95-104.

Maryani N, Denis MS, Lombard L, Crous PW, Kema GHJ (2019) New endemic *Fusarium* species hitch-hiking with pathogenic *Fusarium* strains causing Panama disease in small-holder banana plots in Indonesia. Persoonia 43:48-69

Michail SH, Mathur SB, Neergaard P (1985) Infections of jute, maize and rice not revealed by the standard blotter method of seed health testing. *Journal of Phytopathology* 113:193-199

Naz R., Bano A, Nosheen A, Yasmin H, Keyani R, Shah STA, Anwar Z, Roberts TH (2021) Induction of defense-related enzymes and enhanced disease resistance in maize against *Fusarium verticillioides* by seed treatment with *Jacaranda mimosifolia* formulations. *Scientific Reports* 11:1-15.

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

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM (2009) Novel Multilocus Sequence Typing Scheme Reveals High Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium incarnatum-equiseti* and *F. chlamydosporum* Species Complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 47:3851-3861

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings National Academy Science* 95:2044-2049

O'Donnell K (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22:213-220

Proctor RH, McCormick SP, Alexander NJ, Desjardins AE (2009) Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium*. *Molecular Microbiology* 74:1128-1142

Rai A, Das M, Tripathi A (2019) Occurrence and toxicity of a *Fusarium* mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60:2710-2729

Santos R, Neves AL, Pereira LG, Verneque R, Costa CT, Tabosa J, Scherer C, Gonçalves L (2017) Divergence in agronomic traits and performance of pearl millet cultivars in Brazilian semiarid region. *Japanese Society of Grassland Science* 63:118-127

Santos ACS, Trindade JVC, Lima CS, Barbosa RN, Costa AF, Tiago PV, Oliveira N (2019) Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with insects in Brazil. *Mycologia* 111:244-259

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W (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

Villani A, Moretti A, Saeger S, Han Zheng, Mavungu JDD, Soares CMG, Proctor RH, Venâncio A, Lima N, Stea G, Paciolla C, Logrieco AF, Susca A (2016) A polyphasic approach

for characterization of a collection of cereal isolates of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. International Journal of Food Microbiology 234:24-35

Vismer HF, Shephard GS, Westhuizen LVD, Mngqawa P, Bushula-Njah V, Leslie JF (2019) Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains in vitro. International Journal of Food Microbiology 296:31-36

Wilson JP (2002) Fungi associated with the stalk rot complex of pearl millet. Plant Disease 86:833-839

Wilson JP, Jurjevic Z, Hanna WW, Wilson DM, Potter TL, Coy AE (2006) Host-specific variation in infection by toxigenic fungi and contamination by mycotoxins in pearl millet and corn. Mycopathologia 161:101-107

Xia JW, Denis SM, Crous PW, Zhang XG, Lombard L (2019) Numbers to names – restyling the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. Persoonia 43:186-221

Yadav OP, Rai KN (2013) Genetic Improvement of Pearl Millet in India. Agricultural Research 2:275-292

Zhang XP, Xia JW, Liu JK, Zhao D, Kong LG, Zhu XP (2021) First Report of *Fusarium pernambucanum* Causing Fruit Rot of Muskmelon in China. Plant Disease 106:1997

Tabelas e Figuras

Tabela 2. Isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* FIESC, obtidos de panículas de *Pennisetum glaucum*. Em negrito, isolados obtidos por isolamento direto.

Espécie	Cod. ^a	Obs. ^b	Origem ^c	Ano	Seq. TEF
<i>F. caatingaense</i>	ACB 45	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 189	S/S	Primavera do leste MT 1	2021	x
	ACB 599	C/S	Primavera do Leste MT 2	2021	x
	ACB 600	C/S	Primavera do Leste MT 2	2021	x
	CM 01		Alto Garças MT	2020	x
	CM 19		Não identificado	2020	x
<i>F. hainanense</i>	ACB 12	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	x
	ACB 16	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 44	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 172	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 177	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	x
	ACB 194	C/S	Água Boa MT	2021	x
	ACB 513	C/S	Sinop MT	2021	x
	CM 05		Nova Ubiratã MT	2020	x
<i>F. pernambucanum</i>	ACB 523	C/S	Aliança do Tocantins TO	2021	x
<i>F. sulawesiense</i>	ACB 02	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	x
	ACB 20	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 21	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 25	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 43	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 47	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 50	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 171	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 337	C/S	Nova Ubiratã MT 1	2021	x
	ACB 344	S/S	Nova Ubiratã MT 2	2021	x
	ACB 360	C/S	Ipiranga do Norte MT	2021	x
	ACB 377	C/S	Aliança do Tocantins TO	2021	x
	ACB 488	C/S	Brasnorte MT	2021	x
	ACB 509	C/S	Sinop MT	2021	x
	ACB 530	C/S	Aliança do Tocantins TO	2021	x
	ACB 555	S/S	Água Boa MT	2021	x
	ACB 181	S/S	Primavera do leste MT 1	2021	x
	ACB 186	S/S	Primavera do leste MT 1	2021	x
	CM 04		Nova Ubiratã MT	2020	x
	CM 08		Sorriso MT	2020	x
CM 14		Sorriso MT	2020	x	

<i>F. neosemitectum</i>	ACB 406	C/S	Ipiranga do Norte MT	2021	x
	ACB 459	S/S	Nova Canaã do Norte MT	2021	x
	CM 07		Sorriso MT	2020	x
	CM 09		Sorriso MT	2020	x
	CM 10		Sorriso MT	2020	x
	CM 11		Sorriso MT	2020	x
	CM 12		Sorriso MT	2020	x
	CM 15		Sorriso MT	2020	x
	CM 17		Sorriso MT	2020	x
	CM 18		Sorriso MT	2020	x
<i>Fusarium</i> sp. 1	CM 03		Nova Ubiratã MT	2020	x
“ <i>F. neosemitectum</i> ”	ACB 53	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	
	ACB 155	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
	ACB 326	S/S	Alta Floresta MT	2021	
	ACB 499	S/S	Alta Floresta MT	2021	
	ACB 19	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
“FIESC sp.”	ACB 32	C/S	Nova Ubiratã MT 1	2021	
	ACB 489	C/S	Brasnorte MT	2021	
	ACB 38	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
	ACB 05	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	
	ACB 336	C/S	Nova Ubiratã MT 1	2021	
	ACB 595	C/S	Primavera do Leste MT 2	2021	
	ACB 622	S/S	Jataí GO 3	2021	
	ACB 579	C/S	Nova Ubiratã MT 1	2021	
	ACB 511	C/S	Sinop MT	2021	
	ACB 613	S/S	Formosa do Rio Preto BA	2021	
	ACB 85	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
	ACB 585	S/S	Ribeirão Cascalheira MT	2021	
	ACB 612	S/S	Formosa do Rio Preto BA	2021	
	ACB 03	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	
	ACB 505	C/S	Redenção PA	2021	
	ACB 231	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
	ACB 538	C/S	Jataí GO 4	2021	
	ACB 534	C/S	Aliança do Tocantins TO	2021	
	ACB 64	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	
	ACB 590	S/S	Ribeirão Cascalheira MT	2021	
	ACB 565	C/S	Poxoréu MT	2021	
	ACB 602	C/S	Primavera do Leste MT 2	2021	
	ACB 568	C/S	Poxoréu MT	2021	
	ACB 520	C/S	Nova Canaã do Norte MT	2021	
	ACB 421	C/S	Nova Canaã do Norte MT	2021	
	ACB 517	S/S	Nova Canaã do Norte MT	2021	

^a ACB: Ana Caroline Barros, CM: Caroline Marchi; ^b Sinal de mofo na panícula: C/S: com sinal, S/S: sem sinal; ^c Estados brasileiros: BA: Bahia, GO: Goiás, MT: Mato Grosso, PA: Pará, TO: Tocantins, PA: Pará.

Tabela 3. Isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC, obtidos de panículas de *Pennisetum glaucum*.

Espécie	Cod.^a	Obs.^b	Origem^c	Ano	Seq. TEF
<i>F. brachiariae</i>	ACB 230	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	x
<i>F. verticillioides</i>	ACB 185	S/S	Primavera do leste MT 1	2021	x
	ACB 190	C/S	Poxoréu MT	2021	x
	ACB 191	C/S	Poxoréu MT	2021	x
	ACB 203	S/S	Jataí GO 1	2021	x
	ACB 213	S/S	Jataí GO 3	2021	x
	ACB 298	C/S	Jataí GO 4	2021	x
	ACB 311	C/S	Brasnorte MT	2021	x
	ACB 319	S/S	Alta Floresta MT	2021	x
	ACB 333	C/S	Nova Ubiratã MT 1	2021	x
	ACB 339	C/S	Nova Ubiratã MT	2021	x
	ACB 340	C/S	Nova Ubiratã MT 2	2021	x
	ACB 341	S/S	Nova Ubiratã MT 2	2021	x
	ACB 345	S/S	Formosa do Rio Preto BA	2021	x
	ACB 378	C/S	Ribeirão Cascalheira MT	2021	x
	ACB 441	S/S	Sinop MT	2021	x
	ACB 449	C/S	Aliança do Tocantins TO	2021	x
	ACB 450	C/S	Aliança do Tocantins TO	2021	x
	ACB 455	C/S	Nova Canaã do Norte MT	2021	x
	ACB 460	C/S	Nova Canaã do Norte MT	2021	x
	“ <i>F. proliferatum</i> ”	ACB 367	C/S	Ipiranga do Norte MT	2021
ACB 258		C/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
ACB 309		C/S	Brasnorte MT	2021	
ACB 188		C/S	Primavera do Leste MT 1	2021	
“ <i>F. subglutinans</i> ”	ACB 486	C/S	Brasnorte MT	2021	
	ACB 352	S/S	Formosa do Rio Preto BA	2021	
	ACB 278	S/S	Água Boa MT	2021	
“ <i>F. verticillioides</i> ”	ACB 277	C/S	Água Boa MT	2021	
	ACB 358	C/S	Ipiranga do Norte MT	2021	
	ACB 325	S/S	Alta Floresta MT	2021	
	ACB 197	S/S	Jataí GO 1	2021	
	ACB 205	S/S	Jataí GO 2	2021	
“FFSC sp.”	CM 02		Alto Garças MT	2020	

^a ACB: Ana Caroline Barros, CM: Caroline Marchi;

^b Sinal de mofo na panícula: C/S: com sinal, S/S: sem sinal;

^c Estados brasileiros: BA: Bahia, GO: Goiás, MT: Mato Grosso, TO: Tocantins.

Tabela 4. Isolados do complexo *Fusarium chlamydosporum* FCSC, obtidos de panículas de *Pennisetum glaucum*.

Espécie	Cod.^a	Obs.^b	Origem^c	Ano	Seq. TEF
“FCSC sp.”	ACB 200	S/S	Jataí GO 1	2021	
	ACB 443	C/S	Aliança do Tocantins TO	2021	
	ACB 7	S/S	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	
	ACB 147	S/S	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
	ACB 305	C/S	Brasnorte MT	2021	
	ACB 312	C/S	Brasnorte MT	2021	
	ACB 506	C/S	Redenção PA	2021	

^aACB: Ana Caroline Barros;

^b Sinal de mofo na panícula: C/S: com sinal, S/S: sem sinal;

^c Estados brasileiros: GO: Goiás, MT: Mato Grosso, PA: Pará, TO: Tocantins.

Tabela 5. Isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* FIESC, obtidos de colmos de *Pennisetum glaucum* com sintomas de podridão.

Espécie	Cod.^a	Origem^b	Ano	Seq. TEF
<i>F. compactum</i>	ACB 481	Jataí GO 2	2021	x
<i>F. hainanense</i>	ACB 107	Brasnorte MT	2021	x
	ACB 108	Brasnorte MT	2021	x
	ACB 127	Jataí GO 5	2021	x
	ACB 129	Água Boa MT	2021	x
	ACB 131	Água Boa MT	2021	x
	ACB 468	Alta Floresta MT	2021	x
<i>F. incarnatum</i>	ACB 86	Formosa do Rio Preto BA	2021	x
	ACB 88	Jataí GO 2	2021	x
	ACB 95	Jataí GO 4	2021	x
	CM 20	Não identificado	2020	x
<i>F. sulawesiense</i>	ACB 78	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 103	Nova Ubiratã MT 1	2021	x
	ACB 105	Nova Ubiratã MT 1	2021	x
	ACB 106	Brasnorte MT	2021	x
	ACB 126	Poxoréu MT	2021	x
	ACB 140	Ribeirão Cascalheira MT	2021	x
	ACB 462	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	x
	“FIESC sp.”	ACB 120	Primavera do Leste MT 1	2021
ACB 73		Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
ACB 96		Rondonópolis MT	2021	
ACB 79		Lucas do Rio Verde MT 2	2021	
ACB 476		Rondonópolis MT	2021	
ACB 66		Lucas do Rio Verde MT 1	2021	
ACB 98		São Gabriel do Oeste MS	2021	
ACB 472		Rondonópolis MT	2021	
ACB 101		São Gabriel do Oeste MS	2021	

^a ACB: Ana Caroline Barros, CM: Caroline Marchi;

^b Estados brasileiros: BA: Bahia, GO: Goiás, MT: Mato Grosso, MS: Mato Grosso do Sul.

Tabela 6. Isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC, obtidos de colmos de *Pennisetum glaucum* com sintomas de podridão.

Espécie	Cod.^a	Origem^b	Ano	Seq. TEF
<i>F. brachiariae</i>	ACB 81	Lucas do Rio Verde MT 2	2021	x
	ACB 113	Ipiranga do Norte MT	2021	x
	ACB 122	Ipiranga do Norte MT	2021	x
	ACB 124	Ipiranga do Norte MT	2021	x
<i>F. gigantea</i>	ACB 473	Rondonópolis MT	2021	x
<i>F. madaense</i>	ACB 93	Água Boa MT	2021	x
	ACB 115	São Gabriel do Oeste MS	2021	x
	ACB 132	Luís Eduardo Magalhães BA	2021	x
	ACB 134	Luís Eduardo Magalhães BA	2021	x
	ACB 465	Primavera do leste MT 1	2021	x
	ACB 466	Primavera do leste MT 1	2021	x
<i>F. proliferatum</i>	ACB 464	Lucas do Rio Verde MT 1	2021	x
	ACB 471	Rondonópolis MT	2021	x
“ <i>F. subglutinans</i> ”	ACB 475	Rondonópolis MT	2021	
	ACB 118	São Gabriel do Oeste MS	2021	
“ <i>F. proliferatum</i> ”	ACB 133	Luís Eduardo Magalhães BA	2021	
“ <i>F. nygamai</i> ”	ACB 479	Formosa do rio Preto BA	2021	

^a ACB: Ana Caroline Barros;

^b Estados brasileiros: BA: Bahia, MT: Mato Grosso, MS: Mato Grosso do Sul.

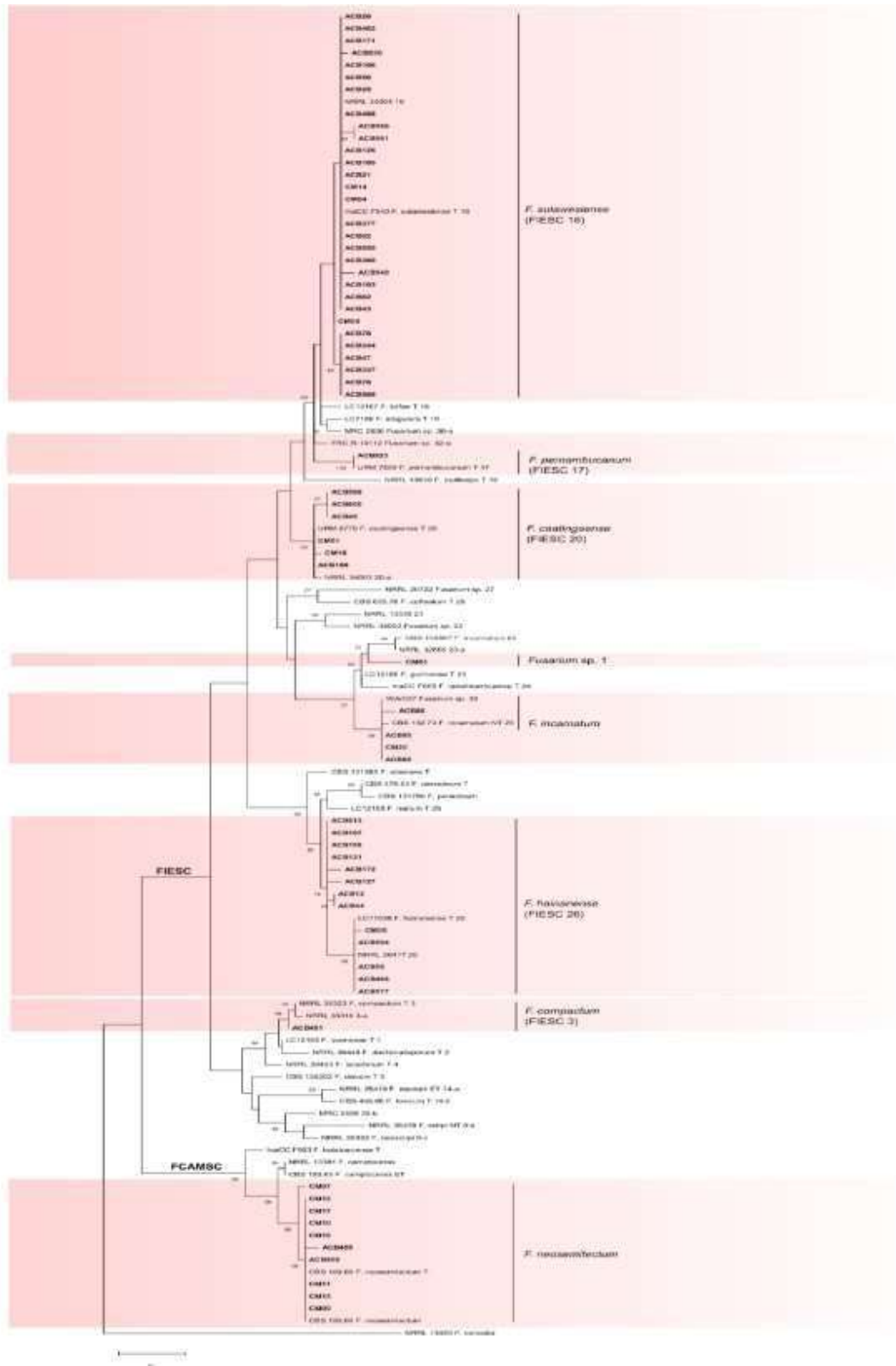


Figura 1. Árvore filogenética de máxima parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos do gene *EF-1α* mostrando a relação de *Fusarium* associada ao mofo da panícula e podridão do colmo com outras espécies dentro do *Fusarium incarnatum-equiseti species complex* FIESC e *Fusarium camptoceras species complex* FCAMSC. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) de MP $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex-epítipo são indicados com T e ET, respectivamente.

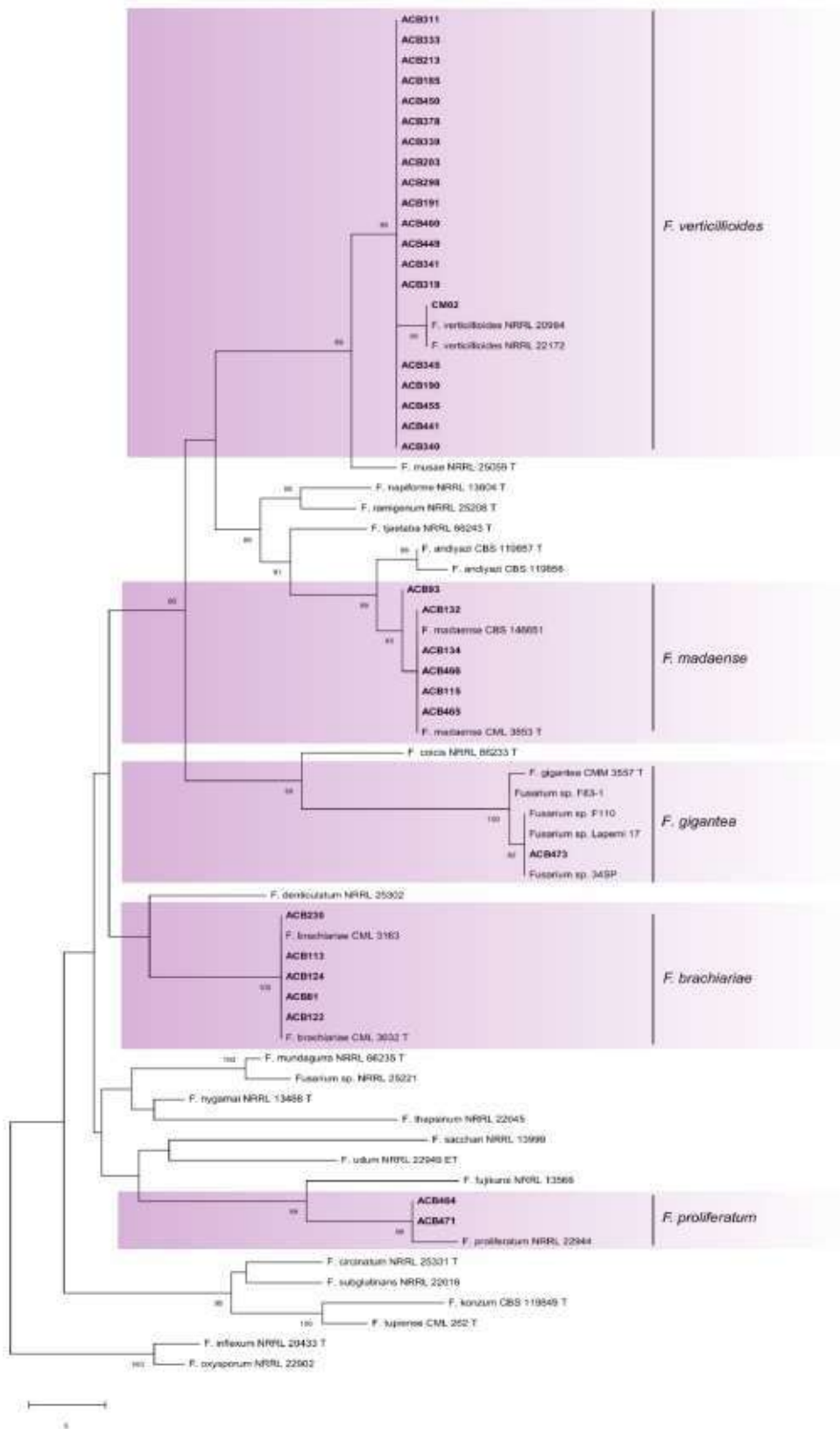


Figura 2. Árvore filogenética de máxima parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos do gene *EF-1α* mostrando a relação de *Fusarium* associada ao mofo da panícula e podridão do colmo com outras espécies dentro do *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC. Os valores debootstrap (1000 réplicas) de MP $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex- epítipo são indicados com T e ET, respectivamente.

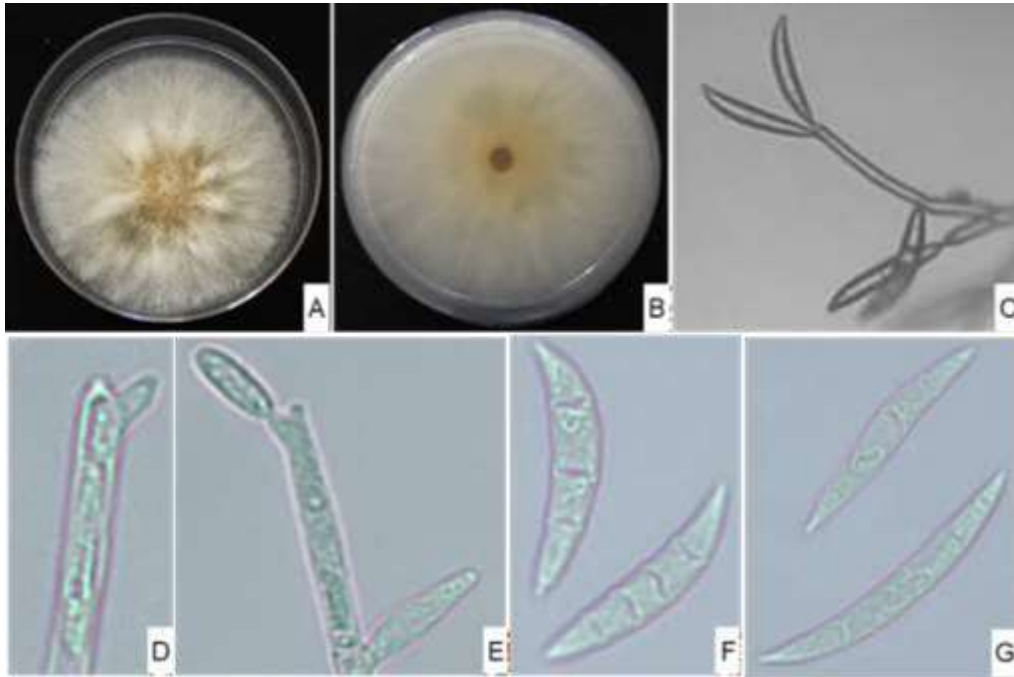


Figura 3. *Fusarium neosemitectum*. **A-B.** Colônias em BDA; **A.** superfície da colônia; **B.** verso da colônia; **C-G.** Fotomicrografias de estruturas reprodutivas; **C.** macroconídios no micélio aéreo; **D-E.** polifiálides; **F-G.** macroconídios formados no micélio aéreo.

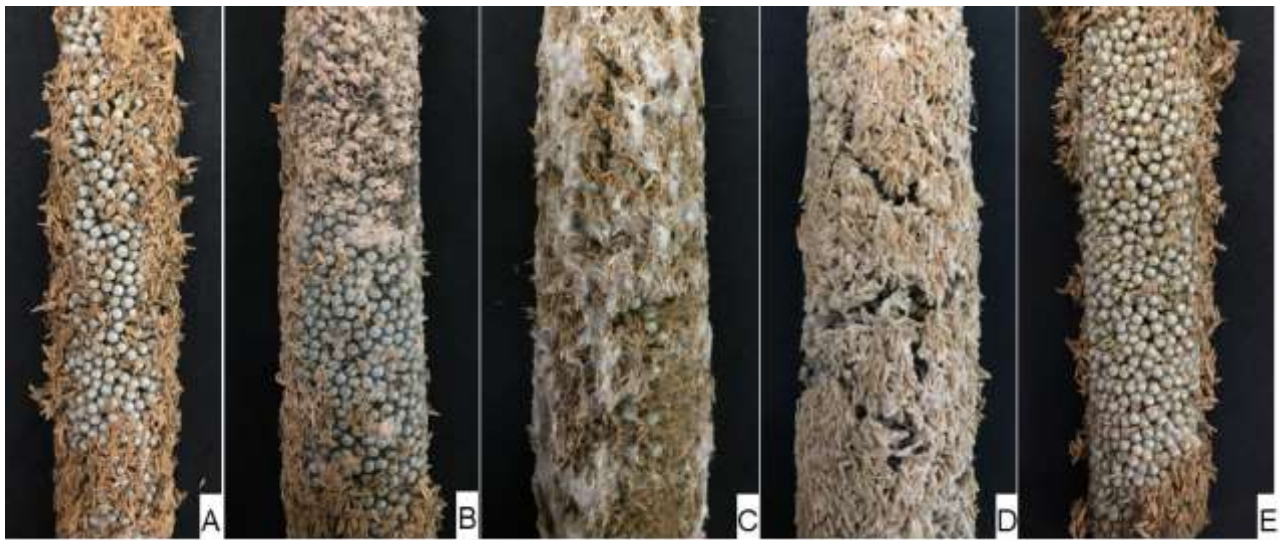


Figura 4. Panículas de milho ADRG 9060 inoculadas com espécies de *Fusarium*. **A.** tratamento controle, sem sinal de mofo. **B.** panícula inoculada com *F. neosemitectum*, com sinal de mofo. **C.** panícula inoculada com *F. caatingaense*, com sinal de mofo. **D.** panícula inoculada com *F. sulawesiense*, com sinal de mofo. **E.** panícula inoculada com *F. brachiariae*, sem sinal de mofo.

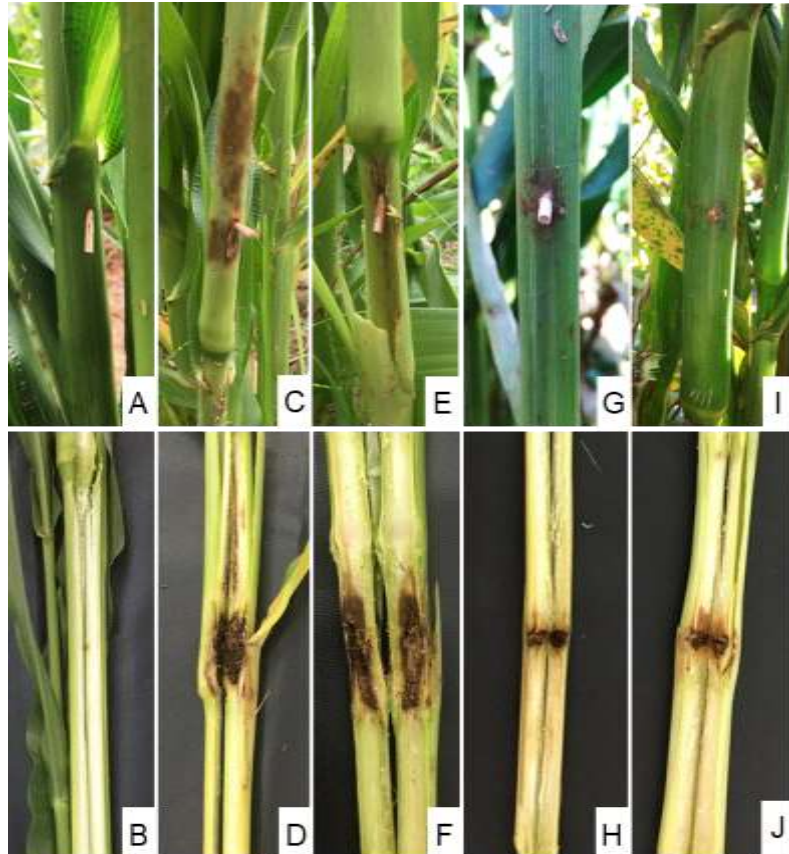


Figura 5. Colmos de milho ADRG 9070 inoculadas com espécies de *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC e *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex FIESC. **A-B.** tratamento controle perfurado com palito estéril; **C-D.** colmo inoculado com *F. madaense*; **E-F.** colmo inoculado com *F. brachiariae*; **G-H.** colmo inoculado com *F. hainanense*; **I-J.** colmo inoculado com espécie representante de “FIESC sp.”.