

NIELSON DE LIMA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Fusarium ASSOCIADOS A GRÃOS DE MILHO**

GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL

JULHO - 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
***Fusarium* ASSOCIADOS A GRÃOS DE MILHO**

NIELSON DE LIMA BARROS

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR

Dr. CRISTIANO SOUZA LIMA

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Produção Agrícola, para obtenção do título de *Mestre*.

GARANHUNS

PERNAMBUCO - BRASIL

JULHO – 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
***Fusarium* ASSOCIADOS A GRÃOS DE MILHO**

NIELSON DE LIMA BARROS

GARANHUNS

PERNAMBUCO - BRASIL

JULHO – 2013

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

B277c Barros, Nielson de Lima
Caracterização morfológica e molecular de isolados
de *fusarium* associados a grãos de milho Nielson de
Lima Barros. - Garanhuns, 2013.

f

Orientador: Cristiano Souza Lima
Dissertação (Mestrado em Produção agrícola) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade
Acadêmica de Garanhuns, 2013.
Inclui Anexos e Bibliografias

CDD: 633.15

1. Produção de milho
 2. Diversidade genética
 3. Fungos e morfologia
 4. Estudo qualitativo
- I. Lima, Cristiano Souza
 - II. Título

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Fusarium ASSOCIADOS A GRÃOS DE MILHO**

NIELSON DE LIMA BARROS

APROVADO EM: 26 DE JULHO DE 2013

Prof^ª. Dr^ª. Erika Valente de Medeiros

UFRPE - UAG

Prof^ª. Dr^ª. Júlia Kuklinsky Sobral

UFRPE - UAG

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Maia Moser

UFRPE - UAG

Prof^º. Dr. Cristiano Souza Lima

UFRPE - UAG

Aos meus pais **Nilson Ferreira de Barros** e **Maria José de Lima Barros**, pela dedicação, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

DEDICO

A minha esposa **Mayara Aline** por estar sempre ao meu lado me dando forças para concluir esse trabalho.

Aos meus irmãos **José Nilson de Lima Barros, Ana Patrícia de Lima Barros e Andréa de Lima Barros** que não tiveram a mesma oportunidade.

OFEREÇO

AGRADECIMENTO

A DEUS pelo dom da vida e por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais Nilson e Maria José, sem os quais não estaria aqui, e por terem me fornecido condições para me tornar o profissional e homem que sou.

Aos meus irmãos José Nilson, Ana Patrícia e Andrea, cunhados, enfim, a toda a minha família, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A minha esposa Mayara Aline pelo companheirismo, incentivo, apoio e compreensão dos inúmeros momentos dedicados a este trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Produção Agrícola pela formação oferecida. Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelos conhecimentos transmitidos

A FACEPE pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

Aos membros da banca, Prof^a Julia Kukinskly, Luciana Maia e Erika Valente pela ajuda e considerações sobre o meu trabalho.

A prof^a Erika Valente pela ajuda na realização desse experimento.

Ao meu orientador Cristiano Souza Lima, pelo apoio, dedicação e por disponibilizar parte de seu tempo para me orientar e pela oportunidade de aprimorar meu conhecimento na área de Fitopatologia.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia André, Josiene, Tassio, Maria e Jessyka, pelos ensinamentos e apoio. Em especial Dyana pela grande ajuda na caracterização molecular.

Aos amigos do Mestrado Apolo, Clarissa, Karol, Aline, Orlando, Luiz, Marcela, Élica, Abraão.

Enfim a todos que, de alguma forma me ajudaram a concluir mais uma etapa da minha vida.

BIOGRAFIA

Nielson de Lima Barros, filho de Nilson Ferreira de Barros e Maria José de Lima Barros, nasceu em Suzano cidade do interior de São Paulo em novembro de 1986.

Iniciou seus estudos em São Paulo na Escola Estadual Aracy Leme Ravache (1ª a 4ª série) concluindo o ensino fundamental e médio em Lagoa do Ouro no Colégio Municipal Jandira Pedrosa.

Em agosto de 2006, ingressou no Curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, graduando-se em agosto de 2011.

Em agosto de 2011 iniciou o curso de Mestrado em Produção Agrícola na mesma instituição sob a orientação do professor doutor Cristiano Souza Lima, defendendo a dissertação em julho de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	18
Obtenção de isolados de <i>Fusarium</i> de regiões produtoras de milho do Brasil	18
Caracterização morfológica	21
Caracterização molecular	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
Caracterização morfológica	24
Caracterização molecular	29

RESUMO

Espécies de *Fusarium* causam doenças importantes no milho como a podridão do colmo e podridão de espigas. Fungos do complexo de espécies *Gibberella fujikuroi* (GFSC) estão entre os agentes causais dessas doenças, como *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum* e *F. verticillioides*. O presente estudo objetivou caracterizar a diversidade de isolados de *Fusarium* de diversas regiões produtoras de milho do Brasil. Para tal, foram utilizados marcadores morfológicos e sequências de fragmento do gene que codifica o fator de elongação 1-alfa (*tef1*). Foram utilizados 50 isolados obtidos de grãos de milho de diversas regiões produtoras do Brasil. Na caracterização morfológica os isolados apresentaram grande variação quanto à coloração das colônias e crescimento micelial. A cor das colônias variou do salmão ao violeta e o diâmetro médio das colônias aos três dias variou de 2,83 cm a 4,07 cm. A maioria dos isolados apresentou cadeias longas de conídios e monofiálides. Poucos isolados apresentaram cadeias curtas, falsas cabeças e polifiálides. Nenhum isolado formou clamidósporo. Pela caracterização morfológica os isolados foram identificados como *F. proliferatum* (4 isolados) e *F. verticillioides* (46 isolados). Na caracterização molecular foi gerada uma árvore filogenética de neighbor-joining a partir de fragmentos sequenciados do gene *tef1*. Dos 50 isolados analisados, 47 agruparam com isolados de referência de *F. verticillioides*, formando um grupo irmão à *F. musae*. Dois isolados agruparam próximo a *F. fujikuroi* e um isolado próximo a *F. proliferatum*. Foram identificados 10 haplótipos dentre os isolados de *F. verticillioides* do Brasil, com seis haplótipos sendo novos para a espécie. Não foi possível agrupar os caracteres culturais e morfológicos com os sub-grupos filogenéticos e haplótipos. Também não houve agrupamento filogenético refletindo localização geográfica dos isolados. Os dados apresentados neste estudo mostram que *F. verticillioides* é a espécie dominante e está amplamente distribuída nas regiões produtoras de milho do Brasil, com alta diversidade genética na população.

ABSTRACT

Fusarium species cause important diseases on maize such as stalk-rot and ear-rot. Fungi in the *Gibberella fujikuroi* species complex (GFSC) are among the causal agents of these diseases, such as *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum* and *F. verticillioides*. The present study aimed to characterize the diversity of *Fusarium* isolates from different maize growing areas in Brazil. Morphological characters and sequences of fragments of the gene that encodes the translation elongation factor (*tef1*) were used to characterize the isolates. Fifty isolates obtained from maize kernels in different growing areas in Brazil were used. In the morphological characterization the isolates showed variation regarding the colony color and mycelial growth. The colony color varied from salmon to violet and the average diameter of the colonies at three days varied from 2.83 cm to 4.07 cm. The majority of isolates showed long chains of conidia and monophialides. A few isolates showed short chains, false heads and polyphialides. None of the isolates formed chlamydospore. Considering the morphological characterization the isolates were identified as *F. proliferatum* (4 isolates) and *F. verticillioides* (46 isolates). In the molecular characterization a neighbor-joining phylogenetic tree was generated from the sequenced fragments of the *tef1* gene. From 50 isolates analyzed, 47 grouped together with reference isolates of *F. verticillioides* forming a sister group to *F. musae*. Two isolates grouped close to *F. fujikuroi* and one isolate grouped close to *F. proliferatum*. Ten haplotypes were identified within the *F. verticillioides* isolates from Brazil, with six haplotypes being new to the species. The cultural and morphological characters could not be grouped according with the phylogenetic sub-groups and haplotypes. The phylogenetic groups also did not reflect the geographical localization of isolates. The data collected in this study show that *F. verticillioides* is the dominant species and is widely distributed in the maize growing regions of Brazil, with high genetic diversity in the population.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de *Fusarium* obtidos de grãos de milho no Brasil 19

Tabela 2. Características morfológicas dos isolados de *Fusarium* do milho no Brasil.. 25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coloração de <i>Fusarium</i> spp. realizada em BDA	27
Figura 2. Micromorfologia de <i>Fusarium</i> spp.....	27
Figura 3. Amplificação de fragmentos de 640 pb do gene que codifica o fator de alongação 1- α (<i>tef1</i>).....	29
Figura 4. Árvore filogenética de “neighbor-joining” do gene <i>tef1</i> dos isolados de <i>Fusarium</i> do milho do Brasil. Números acima dos internódios representam os valores de “bootstrap” para 1000 repetições.....	30

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea da família Poaceae, originária da América Central, sendo cultivada em praticamente todas as regiões do mundo, nos hemisférios norte e sul, em climas úmidos e regiões secas. Em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, o milho se constitui em um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Apresentando um papel importante na economia mundial, devido à sua multiplicidade de aplicações, quer na alimentação humana quer na alimentação animal, assume relevante papel socioeconômico, além de constituir-se em indispensável matéria-prima para inúmeros complexos agroindustriais (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004).

Os Estados Unidos são o maior produtor mundial de milho, seguido da China e do Brasil, com a participação média mundial de 37, 22 e 8% respectivamente (USDA, 2012). Segundo projeções da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), a primeira safra de milho no Brasil em 2013 foi de aproximadamente 35 milhões de toneladas e a segunda safra será cerca de 42 milhões de toneladas, representando crescimento de 2,9 e 13,1%, respectivamente, em relação às safras do ano anterior. O maior produtor de milho brasileiro é estado do Paraná com uma produção anual de aproximadamente 18 milhões de toneladas.

De acordo com Fancelli (2000), o rendimento do milho pode ser influenciado pela densidade de plantio, disponibilidade hídrica, fertilidade do solo, potencial produtivo do híbrido, manejo de plantas daninhas, além de pragas e doenças. Diante disso, ressalta-se que as doenças da cultura, provocadas por fitopatógenos representam um potencial de perdas de produtividade que varia de 8 a 13% (OERKE, 2006). Dentre as doenças que atacam a cultura do milho no Brasil, merecem destaque a mancha branca, a cercosporiose, a ferrugem polissora, a ferrugem tropical, os enfezamentos vermelho e pálido, as podridões do colmo e os grãos ardidos (EMBRAPA, 2009).

Segundo a EMBRAPA (2009) as podridões de colmo destacam-se, no mundo, entre as mais importantes doenças que atacam a cultura do milho por causarem redução de produção e de qualidade de grãos e forragens. Esta doença é causada por diferentes combinações de diversas espécies de fungos e bactérias. Os fungos mais encontrados

associados a doença são: *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson, *Stenocarpella maydis* (Berk.) B. Sutton, *Stenocarpella macrospora* (Earle) B. Sutton, *Fusarium graminearum* Schwabe e *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (PEREIRA, 1997; REIS et al., 2004).

Os principais sintomas encontrados em plantas infectadas por *Fusarium* são: os tecidos dos entrenós inferiores geralmente adquirem coloração avermelhada que progride de forma uniforme e contínua da base em direção à parte superior da planta. Embora a infecção do colmo possa ocorrer antes da polinização, os sintomas só se tornam visíveis logo após a polinização e aumentam em severidade à medida que as plantas entram em senescência. A infecção pode se iniciar pelas raízes e é favorecida por ferimentos causados por nematóides ou pragas subterrâneas (CASELA et al., 2006).

Os agentes causais de podridões de espiga e conseqüentemente dos grãos ardidos mais comumente encontrados em milho são espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, e *Stenocarpella* (PINTO, 2001). Os grãos afetados por *Fusarium* apresentam coloração que varia de rosada, rosa-salmão a avermelhada ou marrom escura e em estados avançados de podridão, pode-se notar um crescimento cottonoso de cor branco-rosada, rosa-salmão ou arroxeadas sobre os grãos. Grãos infectados tardiamente podem exibir estrias brancas no pericarpo. Mas frequentemente o fungo encontra-se no interior dos grãos, não apresentando sintomas característicos (FANTIM; DUARTE, 2009).

O gênero *Fusarium* Link é classificado cientificamente no Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae. Segundo dados do Index Fungorum (2013) este fungo é composto por aproximadamente 1500 nomes de táxons dentre as categorias de espécies, subespécies, variedades e *formae speciales*, compreendendo assim, um grande número de espécies fúngicas que podem ser fitopatogênicas, causando doenças em várias culturas agronomicamente importantes, podendo ser também prejudicial para humanos e animais devido à produção de micotoxinas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Dentre as espécies do gênero *Fusarium*, mais precisamente do complexo *Gibberella fujikuroi*, a que é associada com maior frequência a doenças no milho é *F.*

verticillioides (sinônimo, *Fusarium moniliforme* J. Sheld.; teleomorfo, *Gibberella moniliformis* Wineland), agente causal da podridão do colmo e da espiga.

Além do milho, *F. verticillioides* pode causar doenças em várias outras culturas, tais como, milheto e gramas nativas da América do Norte (LESLIE et al., 2004), bananas, beterraba açucareira, aveia, algodão e em várias forrageiras (BACON; NELSON, 1994), cana de açúcar, arroz e aspargo (STEPHENS et al., 1989). A alta frequência de ocorrência desta espécie é atribuída ao fato da mesma ser de um patógeno polífago e cosmopolita, com ampla capacidade de adaptação em diversos ambientes ocorrendo tanto nas zonas temperadas úmidas e sub-úmidas como nas tropicais e subtropicais (BURGESS et al., 1994)

Fusarium verticillioides é equivalente a *F. moniliforme* (*Gibberella fujikuroi* mating population A) e está incluída dentro da seção *Liseola*, e é caracterizada morfológicamente pela presença de microconídios em longas cadeias produzidas a partir de monofiálides e ausência de clamidósporos. Os microconídios são unicelulares, clavados com base redonda ou truncada e os macroconídios são delgados e septados (3-7 septos), retos ou ligeiramente curvos, fusiformes com célula apical alongada frequentemente curvada e célula basal pediculada (célula pé). A seção *Liseola* atualmente corresponde aproximadamente a um grupo monofilético denominado de complexo *G. fujikuroi* (GFSC) (O'DONNELL et al., 1998; 2000; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O ciclo de vida de *F. verticillioides* em milho se inicia com a permanência em resíduos contaminados na pós-colheita. Os micélios desenvolvidos podem infectar as sementes no solo, desencadeando infecção sistêmica. Entretanto, a via de contaminação mais efetiva consiste na disseminação de macro e microconídios através do ar e gotículas de chuva, que possibilita entrada de conídios pelos tecidos ou estigmas florais, atingindo diretamente o grão (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997a). Pode ocorrer também outro tipo de infecção sistêmica, que se inicia a partir de conídios ou micélio que são transportados no interior, ou sobre a superfície da semente. O fungo se desenvolve dentro da planta jovem, movendo-se das raízes para o caule, e finalmente, para a espiga e grãos (MUNKVOLD et al., 1997b).

A espécie *F. verticillioides* produz várias toxinas, tais como, fumonisinas, ácido fusárico e fusarina C que possuem alto potencial de toxicidade para seres humanos e animais, uma vez que estas toxinas podem ser detectadas em grãos de milho, sintomáticos e assintomáticos. Dentre as toxinas produzidas por esse fungo a que mais se destaca é a fumonisina (NELSON et al., 1993; DESJARDINS et al., 1995; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A ingestão de milho e derivados contaminados com fumonisinas é preocupante devido à sua associação com doenças no homem e em animais. As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em equinos (ELEM), edema pulmonar em suínos e redução no desenvolvimento e imunossupressão em aves. Em ratos, foi comprovada a ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica (GELDERBLOM et al., 1991). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a provável associação com câncer esofágico e câncer hepático primário (UENO et al., 1997).

A correta identificação de espécies do gênero *Fusarium* envolve basicamente a aplicação de três conceitos: (i) o de espécie morfológica, baseada na similaridade dos caracteres morfológicos observáveis, denominados de marcadores morfológicos; (ii) o de espécie biológica, baseado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie; (iii) e o de espécie filogenética, baseado na análise de sequências gênicas (O'DONNELL et al., 2000; TAYLOR et al., 2000; LESLIE et al., 2001; SUMMERELL et al., 2003).

Na caracterização e identificação de espécies de *Fusarium* ainda é importante o emprego de técnicas microscópicas tradicionais, baseadas na observação da morfologia de estruturas reprodutivas, e características fisiológicas (NELSON et al., 1983; LESLIE; SUMMERELL, 2006). No entanto, apenas as características morfológicas não são suficientes para identificar as espécies que ocorrem no milho, podendo levar a identificação errônea quando utilizada como único critério, por isso, se torna necessário à utilização de métodos moleculares (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Nos últimos anos, diversos protocolos que empregam a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos para a identificação de espécies desse gênero (NIESSEN, 2008). Assim, existem protocolos baseados em PCR que utilizam “primers”

ou oligonucleotídeos iniciadores específicos para a identificação da espécie *F. verticillioides* (MULÉ et al., 2004). A identificação também pode ser feita indiretamente, através da amplificação e o sequenciamento de fragmentos de genes conservados, como o gene que codifica o fator de alongação 1-alfa (*tef1*), e sua comparação com sequências de espécies conhecidas depositadas em bancos de dados (GEISER et al., 2004).

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade de isolados de *Fusarium* de diversas regiões produtoras de milho do Brasil. Para tal, foram utilizados marcadores morfológicos e sequências de fragmento do gene que codifica o fator de alongação 1-alfa.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de isolados de *Fusarium* de regiões produtoras de milho do Brasil

Foram utilizados 50 isolados de *Fusarium* (Tabela 1), obtidos a partir de grãos de milho provenientes de várias regiões produtoras de milho do Brasil. Trinta e três isolados foram recuperados da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Profa. Maria Menezes” - CMM, Setor de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. Os 17 isolados restantes foram coletados por Dauri J. Tessmann, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. Os isolados utilizados no presente estudo são provenientes dos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Santa Catarina. Todos os isolados utilizados nesse estudo já estavam sob a condição de cultura monospórica (Tabela 1). Os isolados utilizados, não foram escolhidos ao acaso, os mesmos foram utilizados anteriormente em trabalhos realizados por Melo (2011), no qual foram utilizados “primers” específicos para a identificação dos isolados do Nordeste, dessa maneira foi utilizado no presente estudo apenas os isolados não puderam ser identificados por PCR. Da mesma forma Gomes (2013), realizou diversos cruzamentos com isolados obtidos de diversas regiões produtoras de milho do Brasil, sendo utilizados no presente estudo apenas aqueles que não foram férteis.

Tabela 1. Isolados de *Fusarium* obtidos de grãos de milho no Brasil.

Identificação*	Município	Estado
CMM 3317	Caetés	Pernambuco
CMM 3323	Chã-Grande	Pernambuco
CMM 3332	Caetés	Pernambuco
CMM 3353	Chã-Grande	Pernambuco
CMM 3384	Luis Eduardo Magalhães	Bahia
CMM 3386	Luis Eduardo Magalhães	Bahia
CMM 3403	Pentecostes	Ceara
CMM 3410	Juazeiro	Bahia
CMM 3415	Juazeiro	Bahia
CMM 3423	João Dourado	Bahia
CMM 3424	João Dourado	Bahia
CMM 3426	João Dourado	Bahia
CMM 3428	Luis Eduardo Magalhães	Bahia
CMM 3436	Canhotinho	Pernambuco
CMM 3459	Fortaleza	Ceara
CMM 3460	Fortaleza	Ceara
CMM 3462	São Luiz	Maranhão
CMM 3475	Picos	Piauí
CMM 3491	Luis Eduardo Magalhães	Bahia
CMM 3512	João Dourado	Bahia
CMM 3513	Luis Eduardo Magalhães	Bahia
CMM 3517	São Luiz	Maranhão
CMM 3521	Barra de Corda	Maranhão
CMM 3525	São Luiz	Maranhão
CMM 3531	São Luiz	Maranhão
CMM 3537	Luis Eduardo Magalhães'	Bahia

CMM 3545	Juazeiro	Bahia
CMM 3548	Colônia Leopoldina	Alagoas
CMM 3577	Mossoró	Rio Grande do Norte
CMM 3589	Mossoró	Rio Grande do Norte
CMM 3590	Mossoró	Rio Grande do Norte
CMM 3601	Francisco Santos	Piauí
CMM 3604	Mossoró	Rio Grande do Norte
FVS 23	-	Paraná
FVS 40	-	Paraná
FVS 78	-	Paraná
FVS 86	-	Santa Catarina
FVS 98	-	Santa Catarina
FVT 110	-	Mato Grosso do Sul
FVT 117	-	Mato Grosso
FVT 122	-	Mato Grosso
FVT 127	-	Mato Grosso do Sul
FVT 129	-	Mato Grosso do Sul
FVT 132	-	Mato Grosso do Sul
FVT 141	-	Mato Grosso
FVT 142	-	Goiás
FVT 148	-	Goiás
FVT 169	-	Goiás
FVT 181	-	Goiás
FVT 194	-	Goiás

* CMM – Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Profª. Maria Menezes”, UFRPE, Recife, PE. FVS e FVT – Isolados coletados por Dauri J. Tessmann, UEM, Maringá, PR.

Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada utilizando-se uma adaptação do protocolo de Leslie e Summerell (2006), como descrito a seguir. Os isolados foram inoculados nos meios BDA (batata, dextrose e ágar) e SNA (Ágar pobre em nutrientes).

Para a avaliação da taxa de crescimento micelial, um disco de micélio foi transferido para o centro de uma placa de Petri medindo 6,0 cm de diâmetro contendo BDA, seguido de incubação a 25°C no escuro, por três dias. Após esse período foram realizadas medições do diâmetro ortogonal das culturas crescidas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo a parcela experimental os próprios isolados. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância utilizando o programa estatístico SISVAR.

Para a avaliação da pigmentação da colônia, um disco de micélio foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA, seguido de incubação a 20°C com fotoperíodo de 12 h de luz branca mais luz negra e 12 h no escuro, por 10 a 14 dias.

As avaliações das características micromorfológicas foram realizadas em placas de Petri contendo meio SNA com fragmentos secos e esterilizados de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.), sendo as placas acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD sob a temperatura de 20°C, com fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente mais luz negra e 12 horas no escuro por cerca de 10 a 14 dias. As características observadas foram: presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides, presença ou não de clamidósporos, presença ou não de microconídios em falsas cabeças.

Caracterização molecular

Extração de DNA genômico

Isolados de *Fusarium* foram transferidos para tubos de ensaio contendo BDA, seguido de incubação a temperatura ambiente (25° C) por um período de sete dias. Logo após esse período foi preparada a suspensão de esporos de cada isolado, adicionando-se cerca de 5 mL de água destilada e esterilizada aos tubos de ensaio e agitando-se manualmente por cerca de 30 segundos. Em seguida, essa suspensão foi transferida para

frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio líquido BD (Batata-Dextrose), permanecendo por dois dias, em temperatura ambiente (25°C a 28°C), com agitação manual uma vez ao dia para um crescimento uniforme da massa micelial. Após o período de incubação, a massa micelial formada foi filtrada em papel de filtro estéril, lavada três vezes em água destilada e esterilizada, identificada e armazenada a -20 °C.

A biomassa obtida nesse processo foi congelada em nitrogênio líquido e macerada em cadinho, com pistilo até a formação de um pó fino. Em seguida foi adicionado 1mL de tampão em cada amostra e o produto foi adicionado ao tubo de microcentrífuga. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo baseado em CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônia) (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A integridade do DNA nas amostras foi verificada em gel de agarose a 1%, corado com Syber Safe, Invitrogen, a 13 $\mu\text{L} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, sendo utilizado em cada poço 5 μL de DNA, 2 μL de tampão de amostra (Blue Juice, Invitrogen) e 4 μL de água ultrapura e esterilizada. Completada a corrida, o gel foi colocado em um transiluminador UV e as imagens do DNA genômico foram capturadas com o sistema Gel Logic 112 (Kodak). Foi verificada a integridade das amostras de DNA por comparação de altura e intensidade da banda com marcador 1Kb ladder (Invitrogen).

Amplificação e sequenciamento de fragmento do gene *tef1* dos isolados de *Fusarium*

Para a amplificação e sequenciamento de fragmentos do gene *tef1* dos isolados de *Fusarium* do milho, foram utilizados os “primers” Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998). Os “primers” amplificam fragmentos de 600-630 pb do gene *tef1*. Para a amplificação, as condições de PCR foram de 1 ciclo inicial de 1 minuto a 94°C (desnaturação inicial), seguido de 34 ciclos de 30 segundos de 94°C (desnaturação), 45 segundos a 62°C (anelamento), 60 segundos a 72°C (extensão) e um ciclo final de 5 minutos a 72°C (extensão final). O volume total das reações de amplificação foi de 50 μL , contendo DNA genômico (~20ng. μL^{-1}), 10X PCR buffer, 50 mM MgCl_2 , 28 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 10 mM de cada ‘primer’. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador do modelo MasterCycler, Eppendorf.

Para a visualização em gel de agarose 1%, corado com Syber Safe (Invitrogen) a $13 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, foram retirados $2 \mu\text{L}$ de cada reação e misturado com $1 \mu\text{L}$ de tampão de carregamento (10X Blue Juice). Para verificar o tamanho e a intensidade das bandas foi utilizado o marcador molecular 1Kb ladder (Invitrogen). Completada a corrida, o gel foi colocado em um transiluminador UV e as imagens da amplificação foram capturadas com o sistema Gel Logic 112 (Kodak) Os produtos amplificados por PCR foram enviados para purificação e sequenciamento nas direções sentido e anti-sentido utilizando os “primers” descritos anteriormente, pela empresa Macrogen, sediada na Coréia do Sul.

Análise filogenética

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento de fragmento de *tef1* dos isolados de *Fusarium*, foram analisados visualmente utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999), e as sequências obtidas foram comparadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information - NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>), utilizando o programa BLAST. Os alinhamentos múltiplos das sequências das espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* (O'DONNELL et al., 1998; 2000), e dos isolados de *Fusarium* do milho foram corrigidos manualmente utilizando o programa BioEdit. As análises filogenéticas foram realizadas no programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2000). Na análise filogenética foi utilizado o critério de neighbor-joining. As análises de bootstrap foram baseadas em 1000 repetições e como outgroup foram utilizadas as espécies *Fusarium oxysporum* Schldl. e *Fusarium inflexum* R. Schneid.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica

Os isolados analisados neste trabalho apresentaram diferentes características em relação à coloração, crescimento micelial, tamanho e formato de microconídios e macroconídios, tipos de fiálides e cadeias de conídios (Tabela 2). De maneira geral a coloração apresentada pelos fungos foram características de isolados de *Fusarium*, variando do salmão ao violeta (Figura 1). Segundo Summerell et al., (2003) a pigmentação das culturas deve ser analisada com cuidado, pois, apesar de ser uniforme em algumas espécies, pode variar bastante em outras.

Com relação à média do diâmetro das colônias, houve diferença significativa entre os isolados (Tabela 2), sendo o isolado CMM 3410 o que obteve a maior taxa de crescimento micelial com 4,07 cm. Em contraposição o isolado CMM 3590 obteve a menor taxa de crescimento, apenas 2,83 cm. Não foi possível verificar se algum fator influenciou na taxa de crescimento dos isolados. De acordo com Leslie e Sumerell (2006) a taxa de crescimento micelial pode variar muito entre as espécies de *Fusarium*, pois existem espécies que podem crescer mais rápido ou mais lento do que outras e tais diferenças observadas nem sempre podem ser esclarecidas.

Todos os isolados produziram microconídios unicelulares, com formato variando de ovais a clavados e dispostos em falsas-cabeças (Figura 2A). A maioria dos fungos, cerca de 94% produziram os microconídios sobre monofiálides e em longas cadeias (Figura 2B). Apenas 6% produziram microconídios em cadeias curtas e em polifiálides (Figura 2C). Nenhum dos isolados apresentou clamidósporos. A ausência de clamidósporos é uma característica marcante de *F. verticillioides* e outras espécies do complexo *G. fujikuroi* (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Indicando assim, que os isolados estudados podem pertencer a esse complexo de espécies, visto que tais características estão presentes nos mesmos.

Dentre os isolados analisados, apenas oito apresentaram esporodóquios de coloração alaranjada (Figura 2D) e seus macroconídios possuíam formato falcado com 3 a 5 septos. De acordo com Leslie e Summerell, (2006), a ausência da formação de esporodóquios é uma característica de espécies que estão dentro do complexo *G. fujikuroi*, justificando assim a ausência de esporodóquios da maioria dos isolados.

Tabela 2. Características morfológicas dos isolados de *Fusarium* do milho no Brasil.

Isolados*	Coloração	Diâmetro médio da colônia aos 3 dias (cm)**	Formato de Microconídios	Tipos de Fiálides	Cadeias de Conídios
CMM 3410	Salmão	4,07 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3423	Salmão	4,03 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3545	Violeta	3,98 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3517	Salmão	3,97 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3426	Salmão	3,92 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3460	Violeta	3,90 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVS 86	Violeta	3,88 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3317	Salmão	3,83 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3513	Violeta	3,83 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3475	Violeta	3,83 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3462	Salmão	3,80 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 142	Violeta	3,78 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 132	Salmão	3,77 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3577	Salmão	3,77 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3332	Salmão	3,75 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3601	Salmão	3,75 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3436	Violeta	3,72 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3428	Salmão	3,72 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3548	Violeta	3,68 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3386	Salmão	3,68 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVS 98	Violeta	3,68 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3459	Violeta	3,67 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 194	Violeta	3,65 a	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3589	Violeta	3,62 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3415	Salmão	3,62 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas

FVT 148	Salmão	3,60 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3512	Salmão	3,58 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3537	Salmão	3,58 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3424	Salmão	3,57 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3491	Salmão	3,55 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 129	Salmão	3,55 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3604	Violeta	3,53 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 117	Violeta	3,53 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVS 78	Violeta	3,52 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3531	Salmão	3,52 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 169	Violeta	3,48 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVS 40	Violeta	3,48 b	Oval-Clavado	Polifiálides	Curtas
FVT 141	Violeta	3,45 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 181	Violeta	3,45 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3384	Salmão	3,40 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3521	Salmão	3,40 b	Oval-Clavado	Polifiálides	Curtas
CMM 3525	Salmão	3,37 b	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 110	Salmão	3,32 c	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3353	Violeta	3,32 c	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVT 122	Violeta	3,28 c	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3323	Salmão	3,25 c	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3403	Salmão	3,25 c	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
FVS 23	Salmão	3,13 c	Oval-Clavado	Polifiálides	Curtas
FVT 127	Violeta	3,12 c	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas
CMM 3590	Salmão	2,83 d	Oval-Clavado	Monofiálides	Longas

* CMM – Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Profª. Maria Menezes”, UFRPE, Recife, PE. FVS e FVT – Isolados coletados por Dauri J. Tessmann, UEM, Maringá, PR.

**Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($P > 0,05$).

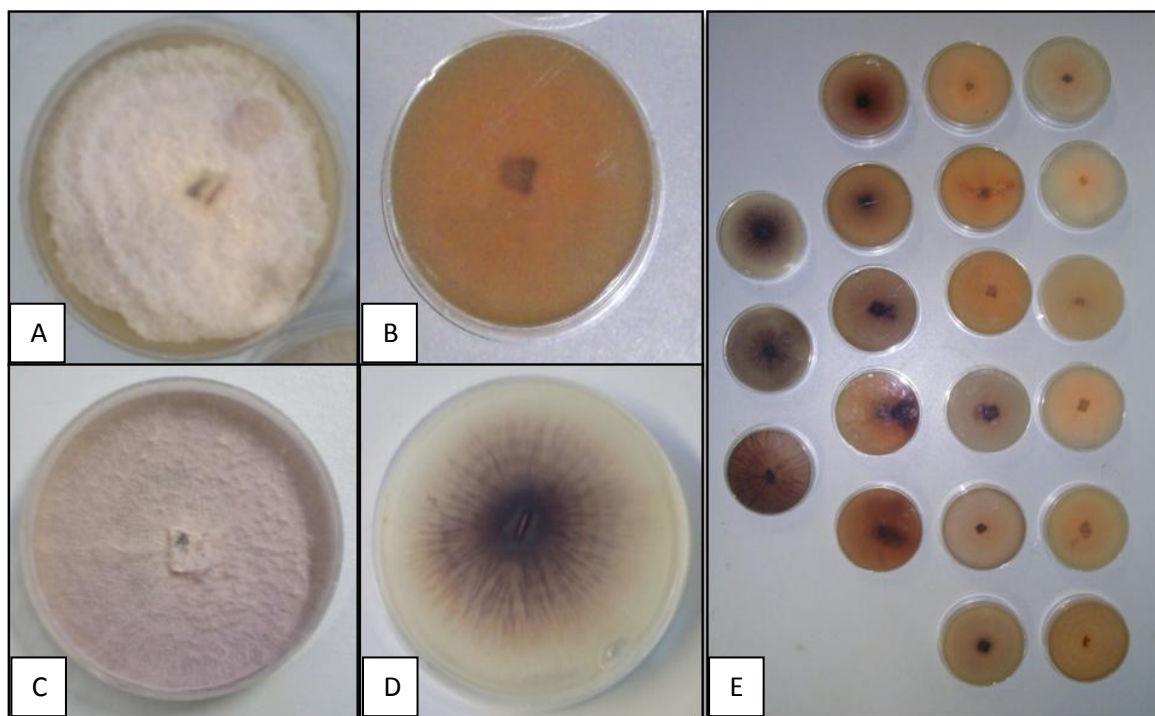


Figura 1. Coloração de *Fusarium spp* realizada em BDA. A e B - coloração salmão; C e D - coloração violeta; E - contraste de cores.

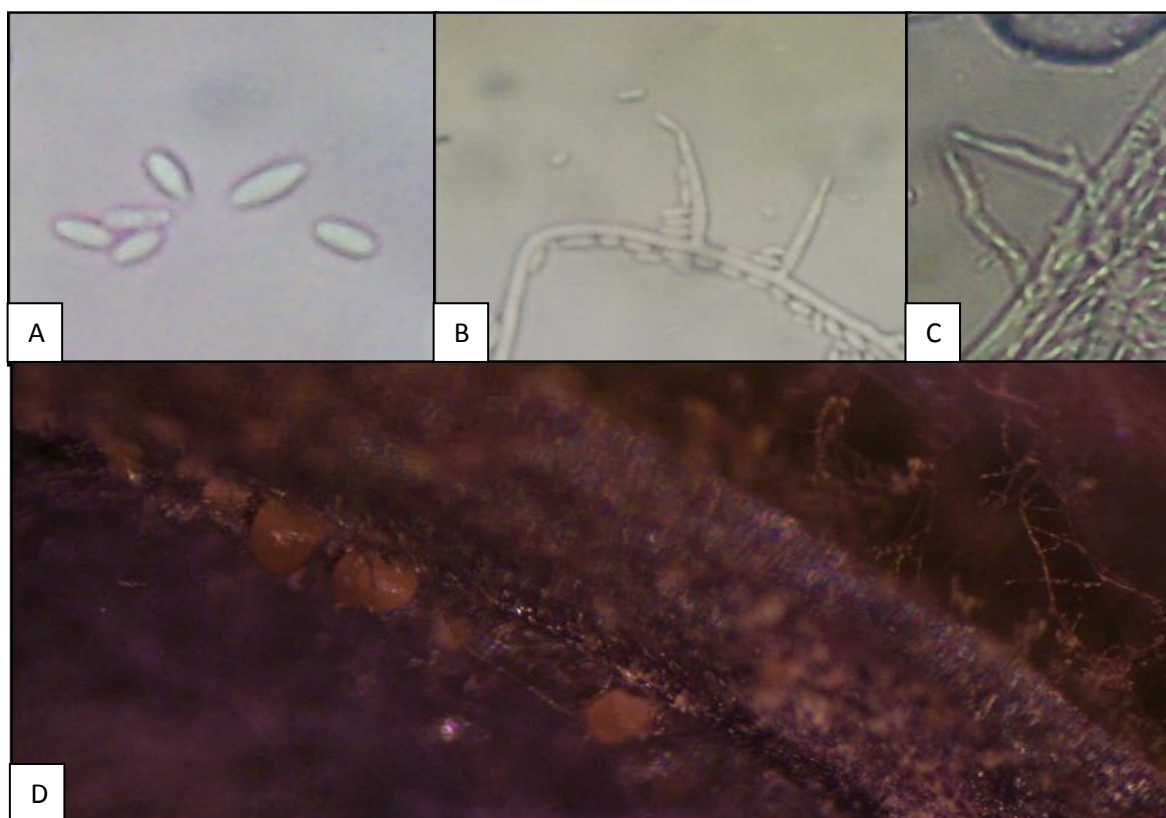


Figura 2. Micromorfologia de *Fusarium spp*. A – Microconídios; B – Monofiáides; C – Polifiáides; D – Esporodóquios

Dessa forma, tomando como base a chave dicotômica de Nirenberg e O'Donnell (1998) é possível identificar a maior parte dos isolados como, *F. verticillioides*, visto que as principais características observadas são correspondentes às da espécie. Os demais isolados que apresentaram cadeias curtas e polifiálides foram identificados como *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg. As principais características para a identificação de espécies dentro do complexo *G. fujikuroi*, no caso específico das espécies associadas ao milho, são a ausência de clamidósporos, a disposição dos microconídios em falsas cabeças ou cadeias curtas ou longas e o tipo de célula conidiogênica que pode ser monofialídica ou polifialídica (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998). Sreenivasa et al. (2006) relatam que a caracterização morfológica entre as espécies *F. verticillioies* (sin. *F. moniliforme*) e *F. proliferatum* devem ser realizadas com muita atenção, visto que as duas espécies são muito semelhantes e podem ser facilmente confundidas, sendo a principal diferença entre elas a formação de monofiálides em fungos da espécie *F. verticillioides* e de mono e polifiálides em *F. proliferatum*.

Diante disso, foi possível constatar que dos 50 isolados analisados com marcadores morfológicos, 47 foram identificados como *F. verticillioides*, evidenciando assim uma alta frequência desse patógeno associado às sementes de milho. Resultados semelhantes foram encontrados por Rahjoo et al. (2008), que analisaram morfológicamente 191 isolados de *Fusarium* e a maioria foram identificados como sendo *F. verticillioides*. Os autores afirmam que a identificação de fungos do gênero *Fusarium* que pertencem ao complexo *G. fujikuroi*, através de caracteres morfológicos, é difícil até para os especialistas.

A predominância de isolados de *F. verticillioides* em sementes de milho também foi relatada por Querales (2010), em estudos realizados com grãos de milho provenientes dos estados da Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, o qual determinou, através da análise de caracteres morfológicos, que de um total de 100 isolados avaliados, 77 foram identificados como *F. verticillioides*, 22 foram *F. proliferatum*, 2 foram *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas e 1 foi *Fusarium* sp., evidenciando assim maior ocorrência de *F. verticillioides* associado a doenças no milho. Bacon e Hinton (1996), relatam que a alta ocorrência de *F. verticillioides* provavelmente está

atrelada, ao fato do mesmo apresentar ampla distribuição mundial e estar associado a diversas doenças no milho, causando podridão do colmo e da espiga, bem como colonização assintomática.

Caracterização molecular

Fragmentos de aproximadamente 640 pb do gene que codifica o fator de alongação 1- α (*tefl*) foram amplificados (Figura 3) e sequenciados para 50 isolados de *Fusarium* obtidos de grãos de milho em diferentes áreas de cultivo no Brasil. As sequências de *tefl* dos isolados obtidos no presente estudo foram alinhadas com sequências de referência de espécies de *Fusarium* do complexo *Gibberella fujikuroi* (GFSC) (O'DONNELL et al., 1998; 2000; LIMA et al., 2012). Algumas espécies desse complexo são frequentemente associadas ao milho, como *F. subglutinans*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*. Foram também incluídas sequências de referência de haplótipos de *F. verticillioides* e *Fusarium musae* Van Hove, Waalwijk, Munaut, Logrieco & Ant. Moretti (VAN HOVE et al., 2011).

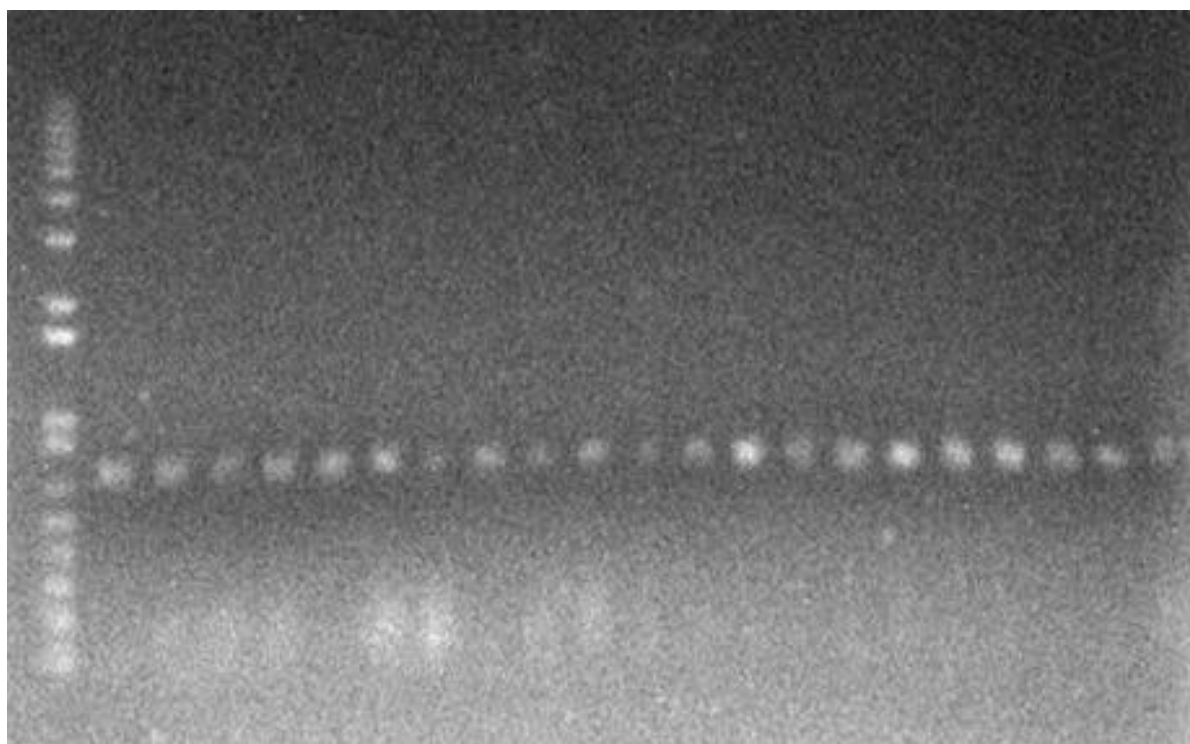


Figura 3. Amplificação de fragmentos de 640 pb do gene *tefl*.

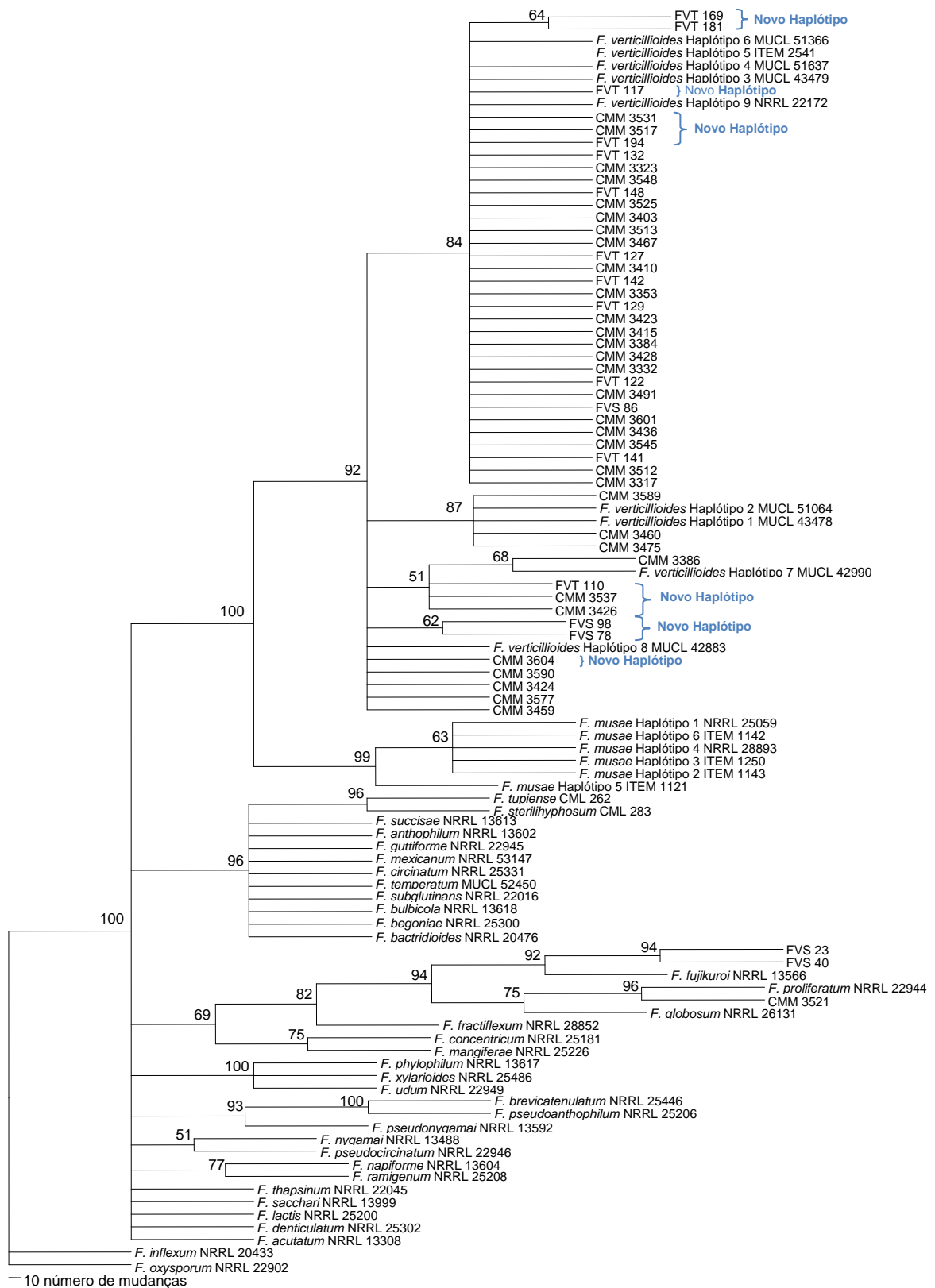


Figura 4. Árvore filogenética de “neighbor-joining” do gene *tef1* dos isolados de *Fusarium* do milho do Brasil. Números acima dos internódios representam os valores de “bootstrap” para 1000 repetições.

A árvore filogenética de neighbor-joining agrupou 47 dos 50 isolados obtidos no presente estudo juntamente com os nove isolados de referência de *F. verticillioides* (Figura 4). O grupo teve suporte de 92% na análise de bootstrap, formando um grupo irmão ao grupo formado pelos isolados de *F. musae* (99% de suporte), espécie mais próxima a *F. verticillioides* (VAN HOVE et al., 2011). O agrupamento do restante das espécies foi semelhante ao observado em estudos anteriores sobre o GFSC (O'DONNELL et al., 1998; 2000).

Considerando-se o gene *tefl* para a definição de haplótipos, os isolados do Brasil identificados como *F. verticillioides* foram divididos em 10 haplótipos. Apenas isolados com sequências idênticas de *tefl* foram considerados como pertencentes ao mesmo haplótipo. A distribuição dos haplótipos dos isolados do Brasil foi a seguinte: o haplótipo 1 reuniu os isolados FVT 132, CMM 3323, CMM 3548, FVT 148, CMM 3525, CMM 3403, CMM 3513, CMM 3462, FVT 127, CMM 3410, FVT 142, CMM 3353, FVT 129, CMM 3423, CMM 3415, CMM 3384, CMM 3428, CMM 3332, FVT 122, CMM 3491, FVS 86, CMM 3601, CMM 3436, CMM 3545, FVT 141, CMM 3512 e CMM 3317; o haplótipo 2 reuniu os isolados FVT 194, CMM 3517 e CMM 3531; o haplótipo 3 reuniu os isolados FVT 169 e FVT 181; o haplótipo 4 apresentou apenas o isolado FVT 117; o haplótipo 5 reuniu os isolados CMM 3459, CMM 3577, CMM 3424 e CMM 3590; o haplótipo 6 apresentou apenas o isolado CMM 3604; o haplótipo 7 reuniu os isolados FVT 110, CMM 3426 e CMM 3537; o haplótipo 8 apresentou apenas o isolado CMM 3386; o haplótipo 9 reuniu os isolados FVS 98 e FVS 78; o haplótipo 10 reuniu os isolados CMM 3589, CMM 3475 e CMM 3460.

Na comparação dos haplótipos de *tefl* do presente estudo com os de van Hove et al. (2011), o isolado CMM 3386 foi idêntico ao isolado representante do haplótipo 7; os isolados CMM 3589, CMM 3460 e CMM 3475 foram idênticos aos isolados representantes dos haplótipos 1 e 2; os isolados CMM 3459, CMM 3577, CMM 3424 e CMM 3590 foram idênticos ao isolado representante do haplótipo 8; os isolados FVT 132, CMM 3323, CMM 3548, FVT 148, CMM 3525, CMM 3403, CMM 3513, CMM 3462, FVT 127, CMM 3410, FVT 142, CMM 3353, FVT 129, CMM 3423, CMM 3415, CMM 3384, CMM 3428, CMM 3332, FVT 122, CMM 3491, FVS 86, CMM 3601, CMM 3436, CMM 3545, FVT 141, CMM 3512 e CMM 3317 foram idênticos aos isolados representantes dos haplótipos 3, 4, 5 e 6.

Os haplótipos 2, 3, 4, 6, 7 e 9 identificados no presente estudo, comparando-se as sequências do gene *tef1*, representam novos haplótipos para a espécie *F. verticillioides*. Este resultado mostra que existe uma grande diversidade genética na população de *F. verticillioides* no Brasil, que além de apresentar haplótipos identificados em uma população mundial de isolados da espécie, apresenta mais seis novos haplótipos.

Três isolados dentre os 50 avaliados não foram identificados como *F. verticillioides*, mas como possíveis isolados das espécies *F. fujikuroi* e *F. proliferatum*. Os isolados FVS 23 e FVS 40 agruparam próximos a *F. fujikuroi*, enquanto que o isolado CMM 3521 agrupou junto com *F. proliferatum*. *F. proliferatum* é considerada como espécie generalista em relação ao hospedeiro e já foi relatada anteriormente no milho (MELO, 2011). Curiosamente, a espécie *F. fujikuroi* é relatada como agente causal de doença na cultura do arroz, porém não é conhecida como patógeno do milho. É provável que estes isolados tenham vindo de áreas onde o arroz é cultivado próximo ao milho. Outra hipótese é de que estes isolados pertencem a uma espécie ainda não descrita, que é próxima a *F. fujikuroi*, já que existem 13 nucleotídeos de diferença na comparação das sequências de *tef1* desses isolados com a sequência de referência de *F. fujikuroi*. Além disso, os isolados formaram um grupo com 94% de suporte de bootstrap e a separação destes de *F. fujikuroi* foi suportada por 92%. Diante disso, faz-se necessário a realização de estudos complementares para verificar se estes isolados são patogênicos ao milho.

Ao se tentar agrupar isolados pelos caracteres culturais e morfológicos, foram gerados grupos que não refletiam os agrupamentos filogenéticos dos isolados de *F. verticillioides* baseados nas sequências do gene *tef1*. O mesmo foi verificado ao se tentar agrupar haplótipos com caracteres morfológicos. A falta de concordância entre caracteres morfológicos e moleculares é um fenômeno comum em espécies de *Fusarium* (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Também não foi possível observar na filogenia grupos de isolados de acordo com a localização geográfica, embora tenha havido uma tendência de agrupamento de isolados das regiões Nordeste e Centro-Oeste (Figura 4).

Os dados apresentados neste estudo mostram que *F. verticillioides* é a espécie dominante. Além disso, apresenta alta diversidade genética representada por 10

haplótipos do gene *tefl*, com seis novos haplótipos para a espécie. Estas informações devem ser consideradas em programas de melhoramento genético do milho no Brasil.

CONCLUSÕES

Considerando-se os dados obtidos no presente estudo.

1. *Fusarium verticillioides* é a principal espécie de *Fusarium* associada aos grãos de milho.
2. Dez haplótipos de *F. verticillioides* representam a variabilidade genética da espécie associada a grãos de milho.
3. Seis haplótipos de *F. verticillioides* são relatados pela primeira vez para o Brasil.
4. Não é possível relacionar os dados morfológicos com os agrupamentos filogenéticos e haplótipos de *F. verticillioides* do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACON, C.W.; HINTON, D.M. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Can. J. Botany*, 74, 1195–1202. 1996

BACON, C. W.; NELSON, P. E. Fumonisin production in corn by toxigênicos strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 514-521, 1994.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S. GOTT, K.P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for Fusarium research**. Sydney: University of Sydney, 1994

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. Doenças na cultura do milho . Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 83). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_83.pdf>. Acesso em: 17 de março de 2013.

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Disponível em: <http://www.conab.gov.br/> acesso em: 10 de julho de 2013

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; NELSEN, T. C.; LESLIE, J. F. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p 79-86, 1995.

EMBRAPA. Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção, 2 ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 5ª edição Set./2009. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_5ed/doencas.htm#002. Acesso em: 15 de março de 2013

FANCELLI, A. L. Fisiologia da produção e aspectos básicos de manejo para alto rendimento. In: SANDINI, I.; FANCELLI, A. L. (Ed.). **Milho: estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 103 - 116.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção do milho**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária. 2004. 360 p.

FANTIN, M. G.; DUARTE, A. P. **Manejo de doenças na cultura do milho safrinha**. Campinas, 2009, 99p.

GEISER, D.M.; JIMÉNEZ-GASCO, M.M; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T.J.; ZHANG, N.; KULDAU, G.A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 110, p. 473–479, 2004.

GELDERBLOM, W. C. A.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247-1251, 1991.

GOMES, A. A. M. Frequência de tipo de acasalamento e distribuição de hermafroditas em populações de *Fusarium verticillioides* associadas ao milho em diferentes zonas climáticas do Brasil. 2013. 45 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/Me/XP/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxord, v. 41, p. 95-98, 1999.

INDEX FUNGORUM, 2013. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/> Acesso em: 20 de março de 2013.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 107-117, Sept. 2001.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORRETI, A.; RITIENI, A. Species diversity and toxin production by strains in the *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from prairie grasses in Kansas. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 2254-2262, 2004.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory Manual**. Sydney. Blakwell. 2006, 388p

LIMA, C. S. ; PFENNING, L. H. ; COSTA, S. S. ; ABREU, L. M. ; LESLIE, J. F. . *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v. 104, p. 1408-1419, 2012.

MELO, M. P. Detecção de espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas em grãos de milho no Nordeste do Brasil. 2011. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013

MULÈ. G.; SUSCA, A.; STEA. G.; MORETTI, A. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v 110, p. 495-502, 2004.

MUNKVOLD, G.P., DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v. 81, p. 556-565, 1997.a

MUNKVOLD, G. P.; HELMICH, R. L.; SHOWERS, W. B. *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. **Phytopathology**, v. 87, p 1071-1077, 1997.b

NELSON, P. E., DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 233-252, 1993.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an Illustrated Manual for identification**. Pennsylvania State University Press. 125p, 1983.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, May/June 1998.

NIESSEN, L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 54, p. 81-138, 2008.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, p. 465-493, May/June 1998.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**. v. 41, p. 61-68, 2000.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**. v.144, p. 31-43, 2006.

PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo : Agronômica Ceres, 1997. V.2, p.538-555.

PINTO, N. F. J. Incidência de grãos ardidos em cultivares de milho precoce. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 27, n. 4, p. 433-436. 2001

QUERALES, P. Identificação morfológica e genética de *Fusarium* spp isolados de sementes e associado a podridão do colmo do milho (*Zea mays* L). 2010. 77 p Tese (Doutorado em Ciências) . Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RAHJOO V.; ZAD J.; JAVAN-NIKKAHAH M.; MIRZADI GOHARI A.; OKHOVVAT S.M.; BIHAMTA M.R.; RAZZAGHIAN J.; KLEMSDAL S.S. Morphological and Molecular Identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. **Journal Plant Pathology**. 90: 463-468, 2008

REIS, E.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. Ed. Lages: Graphel, 2004. 144p.

SREENIVASA, M. Y.; DASS, R. S.; CHARITH RAJ, A. P.; JANARDHANA, G. R. Molecular Detection of Fumonisin Producing *Fusarium* Species of Freshly Harvested Maize Kernels Using Polymerase Chain Reaction (PCR). **Taiwania**, Vol. 51, No. 4, p: 251-257, 2006

STEPHENS, C. T.; DE VRIES, R. M.; SINK, K. C. Evaluation of asparagus species for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* and *Fusarium moniliforme*, **Plant Disease**, v. 24, p. 365-368, 1989.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 117-128, Feb. 2003.

SWOFFORD, D. L. **PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)**. Version 4.0b10, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 2000.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 31, n. 1, p. 21-32, Oct. 2000.

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S. Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3- year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.35, p.1143-1150, 1997.

USDA – United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. Washington, DC: USDA – Agency Reports, 2012. Disponível em: http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=AGENCY_REPORTS. Acessado em: 30 de julho 2013.

VAN HOVE, F.; WAALWIJK, C.; LOGRIECO, A.; MUNAUT, F.; MORETTI, A. *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 570-585, 2011.