

**MARUZANETE PEREIRA DE MELO**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES DE *FUSARIUM* POTENCIALMENTE  
PRODUTORAS DE MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO NO  
NORDESTE DO BRASIL**

**RECIFE-PE**

**JULHO-2011**

**MARUZANETE PEREIRA DE MELO**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES DE *FUSARIUM* POTENCIALMENTE  
PRODUTORAS DE MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO NO  
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. **Dr. Cristiano Souza Lima**

Co-orientador: Prof. **Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara**

Ficha Catalográfica

M528d

Melo, Maruzanete Pereira de  
Detecção de espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de  
Micotoxinas em grãos de milho no nordeste do Brasil / Maruzanete  
Pereira de Melo. -- 2011.  
63 f.: il.

Orientador (a): Cristiano Souza Lima.  
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, Departamento de Fitossanidade, Recife, 2011.  
Inclui apêndice e referências.

1. Diversidade morfológica e genética 2. Compatibilidade vegetativa  
3. Caracterização genética I. Lima, Cristiano Souza, Orientador II. Título

CDD 632

**MARUZANETE PEREIRA DE MELO**

**Orientador:** Prof. Dr. Cristiano Souza Lima

---

**Examinadores**

---

Prof. Dr. Dauri José Tessmann (UEM)

---

Prof. Dra. Maria Nenmaura Gomes Pessoa (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (DEPA/UFRPE)

---

**RECIFE-PE JULHO-2011**

---

À minha querida e eterna mãe por ter sempre me apoiada na busca dos meus sonhos, mesmo na ausência do meu pai conseguiu me dar educação, permitindo que chegasse a uma das melhores Instituições Pública do País. Aos irmãos (as) pelo apoio e aos queridos sobrinho (as) pelos momentos felizes.

### **Dedico**

Aos meus queridos (as) irmãos (as) **Valdete, Elson, João Luiz, Elda, Jaime e Euler**, por não terem tido a mesma oportunidade e todos os professores que participaram da minha formação.

### **Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

À Deus meu eterno guia protetor

Sinceros agradecimentos à todos os professores da **Escola Estadual Professor Tutu**, local onde tudo começou.

Á todos meus familiares pelo apoio e confiança.

Ao grande mestre Professor **João Sebastião de Paula Araújo**, por ter me ensinado a dar os primeiros passos nesta brilhante Ciência que é a Fitopatologia.

Aos avaliadores Dr<sup>a</sup>. **Maria Newmaura Gomes Pessoa**, Dr. **Dauri José Tesmann** e Dr. **Marcos Paz Saraiva Câmara** pelas contribuições para melhoria deste trabalho.

À **UFRRJ** e **UFRPE** duas grandes escolas por terem aberto as portas e oferecido valiosos conhecimentos para minha vida profissional.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE)**, pela concessão da bolsa

Aos grandes amigos que fiz durante o período da UFRRJ: **Deivisson, Bete, José Antônio, Juçaria, Guilherme, Maysa, Luciene, Juliana, Itaynara, Raysa, Evinha, Patusso, Osmir, Suelen, Vandrê, Luiz Santana, Fábio Oséias, Marco Aurélio, Wellinton** e **André** pelos momentos de descontração.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da **UFRPE**

Ao orientador, Prof. Dr. **Cristiano Souza Lima**, pela orientação e pelos valiosos ensinamentos em micologia, especialmente referente ao gênero *Fusarium*.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia: **Francisco Câmara, Francisco Gonçalves, Francisco Conrado, Paulo César, Léo, Emmanuelle, Jean, Cícero, Naldo, Myrzânia, Cléia e Dyana**

Aos amigos do Laboratório de Sistemática e Biologia de Fungos: **Tássio, Emanuel Henrique, José Manoel, Lidiane, Ewerton Bruno e Júnior** pelo convívio e realização deste trabalho.

## Sumário

	<b>Páginas</b>
RESUMO .....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I - Introdução Geral .....	<u>2</u>
1.1- A cultura do milho.....	2
1.2- Sintomatologia da podridão da espiga e do colmo do milho.....	<u>3</u>
1.3- Principais características morfológicas do complexo <i>Giberrella fujikuroi</i> .....	4
1.4- Identificação de espécies de <i>Fusarium</i> do complexo <i>G. fujikuroi</i> .....	6
1.5- Distribuição geográfica e ecologia de algumas espécies do complexo <i>Gibberella fujikuroi</i> .....	7
1.6- Bioecologia do Complexo <i>Fusarium graminearum</i> .....	<u>9</u>
1.7- Micotoxinas produzidas por <i>Fusarium</i> spp. na cultura do milho.....	<u>10</u>
1.8- Micotoxinas produzidas por <i>F. graminearum</i> . .....	12
1.9- Principais vias de infecção de <i>Fusarium</i> spp. em milho .....	14
Referências Bibliográficas.....	15

## RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de grãos milho (*Zea mays* L.), ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China. Os agentes causadores de podridões de espiga e colmo são fungos como: *Stenocarpella maydis*, *Fusarium* spp e *Penicillium oxalicum*, merecendo destaque para as espécies de *Fusarium*, em especial as espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*. As espécies do complexo, frequentemente associado à podridão de colmo e espiga são: *Fusarium verticillioides* (*Gibberella moniliformis*), *Fusarium proliferatum* (*G. intermédia*) e *F. subglutinans* (*G. subglutinans*). Outra espécie como *F. thapsinum* (*G. thapsina*), foi constatado a cultura do milho, porém esta espécie causa grandes perdas à cultura do sorgo. Recentemente, foi descrita uma nova espécie do complexo *Gibberella fujikuroi*, associado a grãos de milho, denominando *F. theperatum*. Estas espécies encontram-se amplamente distribuídos em todo o mundo, sendo *F. verticillioides*, a espécie, mas freqüentemente associado a cultura do milho e outras gramíneas. A identificação de *Fusarium* envolve três conceitos de espécies, o de espécie morfológica baseada na similaridade dos caracteres morfológicos observáveis, denominados marcadores morfológicos; o de espécies biológicas, baseado na compatibilidade sexual entre membros das mesmas espécies; e o conceito de espécies filogenéticas baseado na análise de seqüências gênicas. Fungos pertencentes ao gênero são *Fusarium* potentes produtores de uma variedade de micotoxinas, sendo as mais importantes os tricotecenos (vomitoxinas), fumonisinas, zearalenona, moniliformina e ácido fusárico. Estes metabólicos são substâncias, causa edema pulmonar em suínos, leucoencefalomalácia em eqüinos e em humanos na África do Sul, observou-se alta incidência de câncer de esôfago. Ao analisar os produtos a base de milho, que esta população estava consumindo, constatou altas concentrações de micotoxinas. Espécies de *Fusarium verticillioides*, possui movimento sistêmico em sementes, raízes e colmo, podendo ser transmitido por sementes a longa distância.



## ABSTRACT

Brazil is the third worldwide producer of corn kernel (*Zea mays* L.), only behind of the United States of América and China. The causal agents of ears and stalk rot are fungi like *Stenocarpella maydis*, *Fusarium* spp and *Penicillium oxalicum*, worth mentioning to the *Fusarium* species, specially the complex *Gibberella fujikuroi* species. These species, usually related to ear and stalk rot are: *Fusarium verticillioides* (*Gibberella moniliformis*), *Fusarium proliferatum* (*G. intermedia*) and *F. subglutinans* (*G. subglutinans*). Other species like *F. thapsinum* (*G. thapsina*), were found in corn crop, however this specie causes high loses in sorghum crops. Recently, was described a new specie of the complex *G. fujikuroi*, associated to corn kernels, called *F. theparatum*. These species are widely distributed all the world, being *F. verticillioides* the most frequently associated to corn crop and other grasses. To identify the *Fusarium* are necessary three species concepts: morphological specie, based on similarity of morphological characters nominated morphological markers; the concept of biological specie, based on sexual compatibility between the member of the same specie; and the concept of phylogenetic specie based on genic sequences analysis. Fungi of the *Fusarium* gender are potential producers of many mycotoxins, being the most important the tricothecenos (vomitoxin), fumonisins, zearalenona, moniliformin and fusaric acid. These metabolites are substances that cause pulmonary edema in pigs, leukoencephalomalacia in horses and, in humans in South Africa, it was observed high incidence of esophagus cancer. When was analyzed the corn products that this population was feeding, it was found high concentrations of mycotoxis. *Fusarium verticillioides* species have systemic movement in seeds, roots and stalks, and can be transmitted for long distances by seeds.

## **CAPÍTULO I**

---

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## DETECÇÃO DE ESPÉCIES DE *FUSARIUM* POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO NO NORDESTE DO BRASIL

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1.1- A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.), em função do seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, é um dos principais grãos produzidos e consumidos no Mundo. Independente da tecnologia aplicada, a condição climática durante o cultivo do milho é um dos fatores críticos na produção. Dentre os elementos climáticos, a temperatura é um dos fatores de produção mais decisivos, juntamente com uma adequada disponibilidade de água no solo e abundância de luz. O impacto de deficiência hídrica durante seu cultivo, quando ocorre no início do ciclo pode afetar o processo germinativo e, mais ao final do ciclo, paralisar o crescimento (FACELLI; DORADO NETO, 2004).

Embora o milho seja considerado um insumo para produção de centenas de produtos, cerca de 70% da produção mundial e 80% do milho produzido no Brasil é destinado à cadeia produtiva de suínos e aves (EMBRAPA, 2009), produtos alimentícios tanto *in natura* como em componentes de pães, bolos, margarinas, óleos, polentas, fubá, amido, cereais matinais, dentre outros (BUIATE *et al.* 2006).

A área de plantio deste cereal, em solo brasileiro, na safra 2009/2010 foi de aproximadamente 12 milhões de hectares. Quando comparados os números dessa safra com a anterior, houve uma redução de 16,7% na área cultivada com milho de primeira safra. Essa diminuição pode estar relacionada ao volume do produto no mercado, preços abaixo do esperado pelos produtores e escassez de chuva na região Nordeste na época da semeadura. Já a redução prevista para a segunda safra não foi observada e, ao contrário, ocorreu um incremento de 6,3%. Segundo projeções, a primeira safra foi de 34 milhões de toneladas, 1,3% maior que a anterior e a segunda safra teve uma colheita de 22 milhões de toneladas, representando um crescimento de 10%. Em Pernambuco a produção foi de 486.632 toneladas, apresentando 118.119 toneladas na região do Agreste, que é a segunda em importância no Estado, na safra de 2006 (IBGE, 2011).

No Brasil, o cultivo do milho é caracterizado por duas épocas de plantio. Os plantios de verão ou primeira safra ocorrem durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro, no Sudeste e Centro-Oeste. No Nordeste,

este período ocorre no início do ano. A segunda safra, ou safrinha é plantada extemporaneamente em fevereiro ou março. O milho safrinha não deve ser plantado em sucessão ao milho, devido ao aumento do risco de problemas fitossanitários, como por exemplo, as podridões de colmo, sendo então recomendado cultivar o milho safrinha após a soja precoce (EMBRAPA, 2009).

## 1.2- Sintomatologia da podridão da espiga e do colmo do milho

Os agentes etiológicos de podridões em milho são diversos: *Stenocarpella maydis*, *Fusarium* spp e *Penicillium oxalicum*. Dentre estes merecem destaque é as espécies de *Fusarium*, sendo que grande parte destas espécies se encontra dentro do complexo *Gibberella fujikuroi*, exceção feita à *Fusarium graminearum* e *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium poae*.

O sintoma inicial da podridão é a presença de uma coloração rosada na espiga ou na sua base e geralmente esta doença está presente em todos os campos de milho, em todos os anos. Os grãos afetados apresentam coloração que varia de rosado, rosa-salmão a avermelhada ou marrom escuro e em estados avançados de podridão, pode-se notar um crescimento cottonoso de cor branco-rosada, rosa-salmão ou arroxeadada sobre os grãos. Grãos infectados tardiamente podem exibir estrias brancas no pericarpo. Mas frequentemente o fungo se encontra no interior dos grãos como endófito. Muitas das vezes estes danos estão associados a insetos e injúrias mecânicas na espiga (FANTIM; DUARTE, 2009).

Outro sintoma predominante principalmente, em regiões de clima sub-tropical é a podridão de giberela, causado por *G. zae*, doença, também denominada podridão vermelha ou podridão rosada da espiga, de ocorrência mais frequente na Regiões de clima úmido e ameno, como no Sul do Brasil, onde é constatada na maioria das lavouras de milho devido a grande quantidade de inóculo do fungo produzida nos cereais cultivados e demais gramíneas.

A podridão do colmo do milho é causada por diferentes combinações de diversas espécies de fungos e bactérias. Dentre os mais comumente associados à esta doença encontra-se várias espécies de *Gibberella*, *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*), *Stenocarpella* (*Diplodia*), *Colletotrichum graminicola* e *Macrophomina*. O complexo de podridão do colmo frequentemente causa perdas entre 10-30% AGRIOS (2005).

### 1.3- Principais características morfológicas do complexo *Gibberella fujikuroi*

Antes do início de 1980, a taxonomia morfológica de *Fusarium* da seção *Liseola* subdividiu este grupo em um pequeno número de espécies GERLACH & NIRENBERG (1982), reconheceu sete espécies dentro desta seção, enquanto (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983) reconheceu apenas quatro espécies. A partir desta data, cruzamentos biológicos e marcadores moleculares tem sido utilizado para analisar espécies da seção *Liseola* e têm revelado uma abundância de espécies biológicas e linhagens filogenéticas (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; O'DONNELL et al. 1998; 2000; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O gênero *Fusarium*, segundo a classificação taxonômica, constitui um estado anamórfico da ordem Hypocreales do filo Ascomycota (SEIFERT, 1966). Dentro deste grupo encontram-se as espécies *Fusarium verticillioides* (Saccardo & Neirenberg), *Fusarium proliferatum* (Matsushima & Neirenberg) e *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking), que representam os anamórfos das espécies *Gibberella moniliformis* (Winelland), *Gibberella intermedia* (Kuhlman) Sumuels, Nirenberg & Seifert e *Gibberella subglutinans* (Nelson, Toussoun & Marasmas) Respectivamente. Atualmente, essas três espécies participam de um grupo de aproximadamente 20 espécies que compõem o complexo *Gibberella fujikuroi*, antigamente seção *Liseola* (LESLIE; SUMMERELL, 2006)

*Fusarium verticillioides*, foi primeiramente descrito associado com doença em animal em SHELDON (1904). Também patógeno do milho e encontrado em todas as regiões onde esta cultura é cultivada. Produz microconídios em cadeias longas, clamidósporos ausentes e macroconídios com características típicas do complexo *Gibberella fujikuroi*, como características violeta das colônias em meio BDA, formação de esporodóquios de coloração alaranjada e macroconídios com 3-5 septos.

*F. verticillioides* é morfológicamente idêntico a *F. thapsinum*. Na década de 1990 novas espécies foram descritas no complexo de espécies *Gibberella fujikuroi*. *Fusarium thapsinum* Klittich, Leslie, Nelson & Marasmas, tendo como estágio sexual *Gibberella thapsina*, possui características morfológicas semelhantes à *F. verticillioides*, principalmente em relação à formação de esporos em cadeias. Muitos mas nem todos os isolados de *F. thapsinum* produzem um pigmento amarelo que difunde no meio de cultura (KLITTICH et al., 1997).

*Fusarium proliferatum*, estágio sexual de *Gibberella intermedia*, é uma espécie da *mating population* D. Os macroconídios são típicos daqueles formados pelo complexo de espécies *G. fujikuroi*, sendo encontrado em esporodóquios alaranjado. Os microconídios são formados em cadeias curtas e, menos freqüentemente, em falsas cabeças em monofiálides e polifiálides. As cadeias de microconídios são curtas comparadas com as de *F. verticillioides* e *F. thapsinum*. *F. proliferatum* também não produz clamidósporos, assim como as espécies do complexo *G. fujikuroi* (LESLIE; SUMMERELL, 2006)

*Fusarium subglutinans*, é um patógeno do milho encontrado principalmente em regiões frias onde este cereal é cultivado. Os macroconídios, escassos, são típicos das espécies do complexo *G. fujikuroi*. A célula basal ou célula pé é pouco desenvolvida (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A produção de microconídios é apenas em falsas cabeças, sendo possível ser distinguido de *F. proliferatum* e *F. verticillioides*, que produzem microconídios em cadeias. Um grande número de espécies muito semelhantes a *F. subglutinans* têm sido descritas, incluindo *F. bulbicola*, *F. circinatum*, *F. gutiforme*, *F. mangiferae*, *F. pseudocircinatum*, *F. sachari* e *F. sterilihyphosum* (BRITZ et al. 2002). Tais espécies não são possíveis de serem diferenciadas de *F. subglutinans* a menos que se utilizem marcadores moleculares ou cruzamentos com testadores das espécies biológicas do complexo *G. fujikuroi* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

*Fusarium thapsinum*, causa podridão do colmo do milho. Possui macroconídios típicos do grupo complexo *G. fujikuroi*. Os esporodóquios são raros ou difíceis de serem observados em função do espesso micélio e grande quantidade de cadeias de microconídios. Produzem pouco ou nenhum esporodóquio e macroconídios. Os microconídios, geralmente em cadeias longas, podem ocasionalmente ser encontrados em falsas cabeças. Clamidósporos são ausentes. Forma abundante micélio branco e podendo escurecer, com a presença de pigmentos violeta com a idade da cultura. Esclerócios de coloração negra podem ser produzidos por alguns isolados (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

*Fusarium nygamai*, produz macroconídios abundantes em esporodóquios alaranjado, curto-médio, geralmente com três septos. Os microconídios são pequenos, asseptados, ovais a elípticos e são formados predominantemente em monofiálides e falsas cabeças. Clamidósporos são formados, podendo esta produção ter variação por isolado de raro a muito abundante. Esta espécie possui características morfológicas intermediárias entre *F. verticillioides*, *F. thapsinum* e *F. oxysporum*. Todas essas espécies produzem pigmentação

violeta em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Microconídios de *F. nygamai* são semelhantes aos de *F. verticillioides* (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Segundo Wollenweber & Reinking (1932) *F. nygamai* não pode ser colocado na seção *Liseola*, devido à formação de clamidósporos.

*Fusarium andiyazi* Marasas, Rheeder, Lamprecht, Zeller & Leslie, tem macroconídios, retos a ligeiramente curvos, formados em esporodóquio alaranjado. Os microconídios são produzidos em abundantes cadeias e em monifiálides. Pseudoclamidósporos são formados em BDA, principalmente próximos a pedaços de folha de cravo. O micélio geralmente é flocoso a pulverulento, inicialmente é branco podendo se tornar violeta (LESLIE; SUMMERRELL, 2006).

*Fusarium temperatum*, foi recentemente classificado como uma nova espécie do complexo *G. fujikuroi*. Esta espécie é muito similar morfológicamente a *F. subglutinans*. Os macroconídios são hialinos, apresentando 3-6 septos e formato falcado. Os microconídios abundantes, são produzidos em falsas cabeças e monofiálides cilíndricas, que apresentado formato elipsóides-oval e de 0-2 septos. Assim, como as espécies pertencentes do complexo *G. fujikuroi*, *F. temperatum* não produz clamidósporos. Os autores sugerem que provavelmente, esta espécie foi freqüentemente identificada como sendo *F. proliferatum*, em função das semelhanças morfológicas. O epíteto *temperatum* é em função de grande parte dos isolados serem obtidos de regiões sub-tropical e temperada (SCAUFLAIRE; GOURGUE; MUNAUT, 2011).

#### **1.4- Identificação de espécies de *Fusarium* do complexo *G. fujikuroi***

A identificação de *Fusarium* envolve três conceitos de espécies: o de espécie morfológica baseada na similaridade dos caracteres morfológicos observáveis, denominados de marcadores morfológicos; o de espécies biológicas, baseado na compatibilidade sexual entre membros das mesmas espécies; e o conceito de espécie filogenética baseada na análise de seqüências gênicas.

O conceito de espécies morfológicas tem muita importância para uma classificação inicial de biodiversidade. Caracteres estruturais e fisiológicos têm sido usados como marcadores morfológicos para diferenciar espécies do gênero *Fusarium*, mas o problema é que *G. fujikuroi* consiste de sete espécies biológicas designadas por letras de A a G, com a

maioria pertencente as espécies da secção *Liseola*, estando *F. verticillioides* alocado no grupo A. (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

A seqüência gênica é usada para auxiliar a classificação de espécie de *Fusarium*. Alguns dos mais comumente utilizados são os genes que codificam para a beta-bubulina e fator de alongação (O'DONNELL et al., 2000). A adoção de novos modelos de classificação afeta a taxonomia do gênero já que por décadas foi baseada simplesmente em caracteres morfológicos. Por outro lado também cria controvérsias, pois muitos patologistas de plantas acreditam que tais modelos só acrescentam dificuldades para uma identificação prática na diagnose de agentes causais de doenças, portanto tais modelos estão mais adaptados para os estudos realizados por micologistas.

A espécie *F. moniliforme* é um exemplo dos problemas mencionados acima. Antes de 1996, a espécie englobava espécimes referidos a vários anamórfos hoje conhecidos como, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides* e outras espécies recentemente descritas sob o conceito de espécie biológica e filogenética. Neste ponto o critério biológico foi de muita utilidade, pois foi confirmado que este grupo de espécie pertence aos grupos de compatibilidade A ao H de *Gibberella fujikuroi*, também conhecido como secção *Liseola* (SEIFERT et al., 2003).

Diversos *primers* foram desenvolvidos para identificação molecular de espécies de *Fusarium*, MULÈ et al., (2004) analisaram e seqüenciaram uma porção do gene calmodulina e do espasador ribossomal e desenvolveram *primers* específicos para *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*.

Além de seqüência gênica, outro marcador molecular pode ser utilizado, não só no auxílio de classificação de *Fusarium*. Mas, principalmente, na avaliação do grau de diversidade entre e dentro de população. Este é o caso de marcadores AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

### **1.5- Distribuição geográfica e ecologia de algumas espécies do complexo *Gibberella fujikuroi***

*Fusarium verticillioides* é amplamente distribuído em todo o mundo e está particularmente associado à cultura do milho, onde pode causar podridão do colmo, raiz e



deterioração dos grãos armazenados, resultando em perdas significativas no campo e reduzindo a qualidade dos grãos. Rahjoo et al (2008) ao caracterizarem uma população de 191 isolados de *Fusarium* associados ao milho, por morfologia e testes moleculares, identificaram 140 destes como sendo *F. verticillioides*. Alta frequência da ocorrência desta espécie, é atribuída ao fato de trata-se de um patógeno polífago e cosmopolita, com ampla capacidade de adaptação em diversos ambientes que se estende desde regiões de clima temperado a tropical úmido a subtropical. A maior frequência, contudo é observada em regiões tropicais e subtropicais (ONO et al., 2006). Dentre as espécies do complexo *G. fujikuroi*, *F. verticillioides* é a mais estando comumente associado a grãos de milho e seus subprodutos, em países europeus, como a França, Espanha e Itália (FADOHAN et al., 2003). Segundo Hussein et al. (2002) as espécies predominantes em alguns países africanos é *F. verticillioides*. Em análises de grãos de milho de procedentes da Nigéria, *F. verticillioides* foi a espécie com maior predominância, seguida por *F. graminearum* (ADEJUMO et al., 2007). Além do milho, esta espécie encontra-se associada ao milheto e gramas nativas da América do Norte (LESLIE et al., 2004). Também observado em Bananas, beterraba açucareira, aveia, algodão e em várias forrageiras (BACON; NELSON, 1994), *F. verticillioides* foi relatado causado podridão no ápice de cana de açúcar, podridão do pé de arroz e podridão da coroa do aspargo (STEPHENS; VRIES; SINK, 1989).

*Fusarium subglutinans* (*Gibberella subglutinans*), é encontrado principalmente em regiões temperadas onde o milho é cultivado. É uma espécie que causa podridão do colmo e da espiga do milho e pode ser transmitida por sementes (KABEERE; HILL; HAMPTON, 1997). *F. subglutinans* lato sensu também já foi obtido de gramas nativas na América do Norte (LESLIE et al. 2004). Estes complexos infectos outros hospedeiros como: Banana (JIMENEZ; LOGRIECO; BOTALICO, 1993), milheto (ONYIKE; NELSON; MARASAS, 1991), orquídea (BENYON; SUMMERELL; BURGESS, 1996), sorgo (ONYIKE; NELSON, 1992) e em arroz selvagem (NYVALL; PERCICH; MIROCHA, 1999). Por outro lado, *F. subglutinans* stricto sensu, *G. fujikuroi* “mating population E”, aparentemente, tem o milho como principal hospedeiro.

Segundo Cotten & Munkvold (1998), *F. subglutinans* pode persistir em detritos de milho na superfície do solo ou enterrado no campo por no mínimo 21 meses.

*Fusarium proliferatum*, outra espécie do complexo *G. fujikuroi* merece atenção em função das grandes perdas acarretadas em diversas culturas em especial as gramíneas. Possui

uma distribuição mundial em uma variedade de substratos agrícolas e não agrícolas. É patogênico ao milho, sorgo e aspargo (LESLIE; SUMMARELL, 2006); causando ainda podridão da coroa do aspargo e declínio da palma tâmara (ABDALLA et al., 2000). Associado a rizosfera de *Livistona* em regiões áridas da Austrália (NEUMANN et al., 2004). Outros relatos de hospedeiros para *F. proliferatum* incluem banana (JIMENEZ; LOGRIECO; BOTTANICO, 1997); frutos de citros (HYUN et al., 2000); orquídeas (BENYON; SUMMRELL; BURGESS, 1996); arroz (DESJARDINS et al., 2000). Segundo Bishop (2002), *F. proliferatum* pode ser endófito em aveia, alterando a resposta de defesa neste grupo de planta.

*Fusarium thapsinum* causa a podridão do colmo em sorgo, tendo sido encontrado causando podridão em banana, milho e amendoim (KLITTICH; LESLIE; NELSON MARASAS, 1997). Pode causar podridão do colmo do milho sob condições de casa de vegetação, mas não é comum à cultura em condições de campo. Esta espécie é geograficamente dispersa e tem sido relatada na África, Ásia e América do Norte.

*Fusarium nygamai*, foi identificada inicialmente como sendo *F. moniliforme*, em função de não produzir clamidósporos e formação de microconídios em cadeias. Pode ser encontrada em regiões quentes e frequentemente em locais áridos. Foi primeiramente constatada em colmo de sorgo, causando podridão. *F. nygamai*, pode ser encontrado em regiões úmidas da península da Malásia (SALLEH; STRANGE, 1988) e em arquipélagos da Indonésia. Pode causar podridão de raízes em *Vicia faba* no Sudão (KURMUT et al., 2002); aspargo (ELMER et al., 1997); arroz (ONYIKE; NELSON; MARASAS, 1991) e sorgo (ONYIKE; NELSON, 1992).

### **1.6- Bioecologia do Complexo *Fusarium graminearum***

Por muitos anos *F. graminearum* foi colocado dentro de dois taxa conhecido como *F. graminearum* grupo 1 e *F. graminearum* grupo 2. Morfologicamente é muito difícil diferenciar os dois grupos pelos caracteres morfológicos (LESLIE; SUMMARELL, 2006).

*F. graminearum*, geralmente causa doenças áreas em trigo e milho e produz seu estado sexual geralmente homotalicamente (*Gibberella zeae*). Enquanto, *F. pseudograminearum* (*G. coronicola*), causa doença da espiga do trigo é heterotático e pobremente fértil.

Francis e Burgess (1997), definiu como grupo 1 (*F. pseudogramnearum*) e Grupo 2 (*F. graminearum*). *Fusarium pseudogramnearum*, é inicialmente confundido com *F. graminearum* em função de ser morfológicamente idênticos. Muitos isolados de *F. graminearum* produzem o teleomórfo *G. zae* em CLA ou cenoura-ágar (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Muitos isolados formam muitos peritécios naturalmente e liberam os ascósporos causando doenças nas partes aéreas das plantas como giberela do trigo e aveia (GIBB; WALSH, 1980). Morte descendente do cravo (BROADHURST, 1990). Os peritécios liberam ascósporos após a chuva ou em condições de alta umidade (REIS, 1990).

Peritécios podem permanecer viáveis até 16 meses em grãos de milho (REIS, 1990) ou 23 meses em resíduos de palha de trigo (PEREYRA et al., 2004), sob condições de campo, com viabilidade geralmente duradoura, com longa capacidade para esporular. A temperatura ótima para formação do peritécio é 29 °C. Ambos, ascósporos e macroconídios podem eficientemente iniciar infecções em plantas (STACK, 1989). Ascósporos e macroconídios, ambos são dependentes de umidade, mas os ascósporos são capazes de germinarem em baixa umidade relativa (BEYER et al., 2004).

Segundo Reid et al. (1992) as infecções causadas por *F. graminearum* ocorrem no canal da seda (estigma) e é dependente do genótipo do hospedeiro. Grãos de milho infectados por *F. graminearum* são significativamente menos prováveis de serem infectados por *F. verticillioides* (RHEEDER et al., 1985).

Espécies de *F. graminearum*, geralmente não estão associadas como patógenos em humanos e é resistente a muitos produtos antifúngicos (PUJOL et al., 1997).

### **1.7- Micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. na cultura do milho**

Fungos do gênero *Fusarium* destacam-se como uns dos mais importantes em termos de perdas globais devido às micotoxicoses (SMITH; SEDDON, 1998). Isso se deve ao fato desse gênero ter a capacidade de produzir uma variedade de micotoxinas, sendo as mais importantes os tricotecenos (vomitoxinas e T-2 entre outras), as fumonisinas, a zearalenona, a moniliformina e o ácido fusárico. Os cereais que constituem a dieta das aves, certamente, é a principal fonte dessas toxinas para os animais, uma vez que servem de substrato para o

crescimento dos fungos e a consequente produção de micotoxinas. Porém, nem todo o cereal infestado por fungos está necessariamente contaminado por micotoxinas, uma vez que a produção e concentração dessas substâncias são determinadas por efeitos combinados das espécies de fungos presentes, temperatura e da umidade do grão (RAMAKRISHNA et al., 1996)

A contaminação por micotoxinas é afetada por fatores climáticos como: temperatura e umidade relativa em pré e ou pós- colheita (PATERSON; LIMA, 2010). As condições climáticas no Brasil são, de maneira geral, favoráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos. Entretanto, apesar da área territorial para produção de alimentos no país ser muito extensa, a implantação de padrões nacionais e medidas de fiscalização para o controle de micotoxinas é dificultado (FURLONG et al., 1995). Em um estudo sobre micoflora e contaminação com fumonisinas em milho no Brasil, Ono et al. (1999), os mesmos detectaram que a combinação de alta umidade relativa- temperatura era fator chave para o crescimento fúngico e a posterior contaminação com micotoxinas no campo. No Brasil, existem poucos relatos sobre a incidência de micotoxinas de *Fusarium*, entretanto (CASTRO et al. (1995) mostraram que a micoflora dos grãos de milho do estado de São Paulo constitui-se, predominantemente, de fungos do gênero *Fusarium*; tendo este gênero incidência muito maior que o gênero *Aspergillus*. (ORSI et al. 2000) demonstraram que dentre as espécies de *Fusarium*, *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) é a mais freqüente. Estudos realizados por Stumpf (2011), no Rio Grande do Sul, foi mostrado que de 304 isolados obtidos no estado, 264 isolados foram identificados como sendo *F. verticillioides*. Todos os isolados de *F. verticillioides* apresentaram o gene FUM, sugerindo a contaminação por micotoxinas do tipo fumonisinas. No México, a produção de fumonisinas foi avaliada em isolados de *F. verticillioides*, mostrando que 11 de 13 isolados do Noroeste do país produziram altos níveis (acima de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), uma apresentou valores médios com 500  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e uma apresentou valor abaixo de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Em contraste, isolados do México central, consistiram em baixa produção de fumonisinas. Nenhum isolado de outra espécie de *Fusarium* produziu fumonisinas (SÁNCHEZ-RANGEL et al., 2005). Este resultado está de acordo com outras análises realizadas no norte do México, como o estudo de (DESJARDINS; PLATTNER; NELSON, 1994). Na Espanha e em outros países *F. verticillioides* foi a espécie mais freqüentemente associada a grãos de milho (ARINO et al.,2007). No estudo realizado por (ARINO et al., 2007), dos 10 isolados de milho convencional, 80% produziram FB1 e FB2. Para os isolados de milho orgânico, 80% produziram FB1 e 70% produziram FB2. Houve um elevado grau de

variabilidade na concentração de fumonisinas produzidas pelos isolados de *F. verticillioides* do plantio convencional quando comparado com o cultivo orgânico. Porém, essas diferenças não foram significativas entre os tipos de cultivo.

Dentre as espécies de *Fusarium* produtoras de micotoxinas, as mais importantes são: *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. roseum*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum* (LESLIE; SUMMERELL, 2006)

Fumonisinás é um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides*, causando diversos problemas veterinários, em frangos de cortes. Pesquisas realizadas por Ledoux et al. (1992) demonstraram que a fumonisinás B1 pode causar diminuição do ganho de peso, aumento no tamanho do fígado, proventrículo e moela, causando atrofia cortical tímica. Em frangos de corte, a intoxicação por fumonisinás pode revelar aumento nas concentrações séricas de cálcio, colesterol e da enzima aspartato amino transferase (ESPADA et al., 1994). Já Henry e Wyatt (1994) relatam que 80 ppm de fumonisinás puras não afetam o desempenho de franco de cortes.

Em suínos, o consumo de milho contaminado por *F. moniliforme* na safra de 1989, nos EUA, levou ao aparecimento de uma doença caracterizada por severo edema pulmonar e do hidrotórax. Foram colhidos grãos de milho de duas fazendas, onde 34 suínos adultos morreram de edema pulmonar, cinco dias após o consumo do alimento contaminado (HARRISON et al., 1990).

### **1.8- Micotoxinas produzidas por *F. graminearum*.**

Tricotecenos, um grupo de sesquiterpenos, são comumente detectados em grãos de aveia, trigo, cevada e milho (DESJARDINS et al., 2000). Estão fortemente relacionados às toxicoses crônicas fatais em humanos e animais, devido a seus efeitos imunossupressivos e inibidores da síntese protéica em eucariontes (BRYDEN, 2007). Evidências históricas associam surtos de toxicoses no Japão relacionados ao consumo de grãos contaminados por *F. graminearum* em 1900 e também após 1945, o caso conhecido como akakabi-byo (DESJARDINS; HUH; MCCORMICK, 1993).

Nivalenol (NIV) e desoxinivalenol (DON) são tricotecenos mais freqüentemente produzidos por *F. graminearum* e esses têm sido relatados em amostras de milho

naturalmente contaminado nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Nova Zelândia e outros países. Na Nova Zelândia, a contaminação do milho com micotoxinas de *Fusarium* têm apresentado conseqüências graves para os suínos quando os níveis de DON e NIV alcançaram um nível de 0,4 a 0,5 mg/Kg na dieta animal. (HUSSEIN et al., 2002).

No Brasil, como conseqüências das dimensões continentais do país e níveis distintos de tecnificação dos produtores, existe a possibilidade de que a presença e o teor de micotoxinas em alimentos produzidos e consumidos sejam desiguais entre as diversas regiões (KAWASHIMA; SOARES, 2006). Pesquisa realizada por Ono et al. (1998), onde analisaram 113 amostras de milho recém-colhido, provenientes das regiões Centro-Sul e Centro-Oeste do Estado do Paraná, na qual se constatou a predominância de colônias com características morfológicas de *Fusarium* spp. Em relação a análise de micotoxinas, observou-se que amostras da região Centro-Oeste apresentaram teores de fumonisinas (FB1 e FB2) mas elevados em relação às amostras da região Centro-Sul do Paraná. Isto provavelmente se deve as diferenças das condições climáticas entre as duas regiões.

As toxinas da classe dos tricotecenos são divididas nos grupos A, B, C e D, em função da presença ou ausência de grupos funcionais característicos e dos fungos que os produzem (UENO et al., 1973). Alguns desses grupos têm maior relevância para os cultivos de cereais, no caso, os tipos A e B. Tricotecenos-A incluem a toxina T-2, HT-2 E diacetoxiscirpenol (DAS), com mais alta toxicidade em relação aos tricotecenos-B, que incluem desoxinivalenol (DON), suas duas formas acetiladas (3- e 15-acetildesoxinivalenol) e nivalenol (NIV). No entanto, o tipo B destaca nesta classe devido à maior prevalência e altos níveis detectados em grãos de diversos cereais. Apesar de serem produzidos por outras espécies do gênero, como *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. equiseti* (DESJARDINS et al., 1993). Tricotecenos-B tem sido principalmente utilizado como forma de distinguir e identificar representantes do Complexo *Fg*, uma vez que diferentes fúngicas apresentam um perfil toxicogênico característico (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

A biossíntese de tricotecenos deriva de uma molécula precursora denominada tricodieno, um produto natural isolado pela primeira vez em 1948 de *Trichotecium roseum* (DESJARDINS et al., 1993). Sua síntese compreende uma seqüência de oxigenações, isomerizações, ciclizações e esterificações que levam a molécula básica tricodieno a formar complexas estruturas como diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2, desoxinivalenol e nivalenol

(DESJARDINS, 2007). Esta rota metabólica requer a expressão de inúmeras enzimas, sendo que mais de 50% destas são expressas por um cluster, o cluster tri (KIMURA et al., 2003).

### **1.9- Principais vias de infecção de *Fusarium* spp. em milho**

A infecção do grão de milho pode ser consequência da inoculação do estigma com suspensão de esporos de *Fusarium* (MUNKVOLD et al., 1997). *F. verticillioides* possuem movimento sistêmico em sementes, raízes e colmos, e já foi documentado com o uso de vários métodos. Podendo ser transmitido através das sementes infectadas (WILKE et al., 2007). Estudos realizados por Ducan e Howard (2009), revelaram que esporos de *F. verticillioides* aderem sobre o grão e pólen, formando um emaranhado de hifas. Vários estudos mostram que o fungo ganha acesso para o grão via canal do estigma (WOLF et al., 1952).

Segundo Bacon e Hinton (1996), *Fusarium moniliforme* (sin.: *F. verticillioides*) é um fungo que se comporta como endófito não somente em grãos, mais também em folhas, caule e raízes. Observaram que durante o período de colonização, não houve mudança na integridade na célula e organelas do hospedeiro, sugerindo que o fungo não produziu toxinas responsáveis pela desintegração da célula do hospedeiro. Já em variedades suscetíveis em tecidos com expressão de sintomas observaram início da separação da lamela média das células atacadas, seguido de colonização intracelular e formação de papilas na parede da célula. Em estágio avançado de colonização foi observada destruição da integridade das organelas do hospedeiro, seguido da ausência da integridade da membrana citoplasmática e presença de citoplasma granulado. A proporção de infecções assintomáticas em grãos de milho pode ser em função do genótipo e hospedeiro (KING; SCOTT, 1981).

### Referências Bibliográficas

ABDALLA, M. Y.; AL.ROKIBAH, A.; MORETTI, A.; MULÈ, G. Pathogenicity of toxigênico *Fusarium proliferatum* from palm in Saudi Arabia. **Plant Disease**, v. 84, p. 321-324, 2000.

ADEJUMO, T. O.; HETTWER, U.; KARLOVSKY, P. Survey maize from southwestern Nigeria zearenolone, alpha and beta-zearelons, fumonisin B1 and enniatins produced by *Fusarium* species. **Food additives and Contaminants**, v. 24, p. 993-1000, 2007.

AGRIOS, N. G. **Plant Pathology**, Department of Plant Pathology, 2005, 980p.

ARIÑO, A. et al. Estimation of dietary intakes of fumonisinas B1 e B2 from conventional and organic corn. **Food control**, v. 18, p. 1058-1062, 2007.

BACON, C. W.; HILTO, D. M. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. **Canadian Journal Botanic**, v. 74, p. 1195-1202, 1996.

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

BENYON, F. H. L.; SUMMERELL, B. A.; BURGESS, L. W. Association of *Fusarium* species with root rot of *Cymbidium* orchids. **Australasian Plant Pathology**, v. 25, p. 226-228, 1996.

BISHOP, D. L. Gene expression of a vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, p. 65-71, 2002.



BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Two new species of *Fusarium* Section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**, New York, v. 94, p. 722-730, 2002.

BROADHURST, P. G. *Fusarium graminearum* causing stub dieback of carnations in New Zeland. **New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 18, p. 137-140, 1990.

BRYDEN, W. L. Mycotxins in the food chain: human health implications. **Asia Pac J Clic Nutri**, v. 1, p. 95-101, 2007.

BUIATE, E. A. S. *et al.* Reação de híbridos de milho e levantamento dos principais fungos associados ao complexo de patógenos causadores de “grãos ardidos” em Minas Gerais. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

CASTRO, M. F. P. M et al. Fumonisin in brazilian corn-based foods for infant consumption. **Food additives and Contaminants**. London, v. 21, p. 693-699, 1995.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Disponível em <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 02 de novembro 2010.

COTTEN, T. K.; MUNKVOLD, G. P. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *Fusarium subglutinans* in maize stalk residue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 550-555, 1998.

DESJADINS, A. E.; MANANDHAR, H. K.; PLATTNER, R. D.; MANANDHAR, G. G.; POLING, S. M.; MARAGOS, C. M. *Fusarium* species from nepalense Rice and production of mycotoxins and gibberellic acid selected species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 1020-1025. 2000.

DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M.; MICCORMICK, S. P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance, **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 595-604, 1993.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; NELSON, P. E. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* from maize in northeast México. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1695-1697, 1994.

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. **In. J. Food Microbiol.** v. 119, p. 47-50, 2007.

DUCAN, K. E.; HOWARD, R. J. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 23, p. 6-16, 2010.

EMBRAPA. Cultivo do Milho. Sistemas de Produção. 4. ed., set., 2009.

ESPADA, Y.; GOPEGUI, R. R.; CUADRADAS, C et al. *Fumonisin* mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. **Avian Disease**, v. 38, p. 188-192, 1993.

FACELLI, A. L.; DORADO NETO, D. **Produção de milho** 2. ed. Guaíba: Agropecuária. 2004. 360p.

FANDOHAN, P. et al. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in África. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 570-579, 2003.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGIA, D. **Introduction al uso de marcadores moleculares en El análisis genético**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998, 220p.

FRANCIS, R. G.; BURGESS, L. W. Characteristic of two populations of *Fusarium roseum* "Graminearum" in eastern Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 68, p. 421-427.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi, **Mycol. Res**, v. 112, p. 231-240, 2008.

FURLONG, E. B. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state São Paulo, Brasil. *Mycopathologica*, **Mycopathologia**, v. 131, p. 185-190, 1995.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D. The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 73, p. 100, 1994.

HUSSEIN, H. M. et al. Occurrence and distribution of *Fusarium* species in maize fields in New Zealand. **Mycopathologia**, v. 22, p. 25-30, 2000.

IBGE. **Censo Agropecuário**. [online]. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 jun. 2011.

JIMENEZ, M. T.; LOGRIECO, A.; BOTALCO, A. Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in banana fruits. **Journal of Plant Pathology**, Bary, v. 137, p. 214-220, 1993.

KABEERE, F.; HILL, M. J.; HAMPTON, J. G. The transmission of *Fusarium subglutinans* from maize seeds to seedlings. **Australian Plant Pathology**, Sidney, v. 26, p. 126-130, 1997.

KIMURA, M.; TOKAI, T.; O'DONNELL, K.; WARD, T.J.; FUJIMURA, M.; HAMAMOTO, H.; SHIBATA, T.; YAMAGUCHI, I. The trichothecene biosynthesis gene cluster of

*Fusarium graminearum* F15 contain a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. **Febs Lett**, v. 539, p. 105-110, 2003.

KING, S.B.; SCOTT, G. E. Genotypic differences in maize (*Zea mays*) to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 71, p. 1245-1247, 1981.

KLINTTINCH, C. J. R.; LESLIE, J. F.; NELSON, P. E.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in seção *Liseola* from sorghum. **Mycologia**, NEW YORK, v. 89, p. 643-652, 1997.

KURMUT, A. M.; NIRENBERG, H. I.; BOCHOW, H.; BUTTNER, C.; *Fusarium nygamai*, causal agent of root rot of *Vicia faba* L. in the Sudan. **Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen University Gent**. v. 67, p. 269-274, 2002.

LEDOUX, D. R.; WEIBKING, T. S.; ROTTINGHAUS, G. E.; SMITH, J. E. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known level of fumonisins B1 on turkeys poults. **Poultry science**, v. 71, p. 262, 1992.

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

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

MARASAS, W. O. F.; RHEEDER.; J. P.; LAMPRECHT, S. C.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. *Fusarium andiyazi* sp. Nov., new species from sorghum. **Mycologia**, New York. v. 93 p. 1203-1210.

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.

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

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

NEUMANN, M. J.; BACKHOUSE, D.; CARTER, B. A.; SUMMERELL, B. A.; BURGESS, L.W. Genetic structure of populations of *Fusarium proliferatum* in soils associated with *Livistona mariae* palms in Little Palm Creek, Northern Territory, Australia. **Australian Journal Botany**, v. 52, p. 543-550, 2004.

NYVALL, R. F.; PERCICH, J. A.; MIROCHA, C. J. *Fusarium* head blight of cultivated and natural wild rice (*Zizania palustris*) in Minnesota caused by *Fusarium graminearum* and associated *Fusarium* spp. **Plant Disease**, v. 83, p. 159-164, 1999.

O` DONNELL, K.; NIREREMBERG, 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.

ONYIKE, N. B. N.; NELSON, P. E. *Fusarium* spp. Associated with sorghum grain from Nigeria, Lesotho and Zimbabwe. **Mycologia**, v. 84, p. 452-458, 1992.

ONYIKE, N. B. N.; NELSON, P. E.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* spp associated with millet grains from Nigeria, Lesotho and Zimbabwe. **Mycologia**, New York, v. 83, p. 708-712, 1991.

ORSI, R. B. Microflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal Stored Products Research**, v. 36, p. 75-87, 2000.

PATERSON, R.R.M.; LIMA, N. How Will climate change effect mycotoxins in food? Food Reseach International, v. 10, p. 111-119, 2010.

PUJOL, I.; GUARRO, J.; GENE, J.; SALA, J. In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 39-47, 1997.

RAJHOO, V.; ZED, J.; GAVAN-NIKKAHAH, M.; MIZARDI, G.A.; OKHOVVAT, S.M.; BIHAMTA, M.R.; RAZZAGHIAN, J.; KLEMSDAL, S.S. Morphological and Molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Irã. **Journal Plant Pathology**, Bary, v. 90, p. 463-468, 2008.

RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J.E. *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin B1 formation in barley grain during interactions with other fungi. **Mycopathologia**, v. 136, p. 53-63, 2006.

REIS, E. M. Survival of perithecia of *G. zeae* on naturally infected wheat kernels under field conditions. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 254-255, 1990.

REIS, E. M. Effects of rain and relative humidity on the release of ascospores and on the infection of wheat heads by *G. zeae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 339-343, 1990.

REID, L. M.; MATHER, D. E.; HAMILTON, R. I.; BOLTON, A. T. Diallel analyses of resistance in maize to *Fusarium graminearum* infection via the silk. **Canardian Journal of Plant Science**, v. 72, p. 915-923, 1992.

SALLEH, B.; STRANGE, R. N. Toxigenicity of some Fusaria associated with plant and human diseases in Malaysian Peninsula, Malaysia. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 841-848, 1988.

SANCHEZ-RANGEL, D.; SAN JUAN BADILLO, A.; PLASENCIA, J. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in México and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1021-1029, 2005.

SCAUFLAIRE, J.; GOURGUE, M.; MUNAUT, F. *Fusarium temperatum* sp. Nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. **Mycologia**, v. 103, 2011.

SEIFERT, K.A et al. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. **Mycological Research News**. Amsterdam, v. 107, p. 643-644. 2003.

SMITH, T. K.; SEDDON, I. R. Synergism demonstrated between *Fusarium* mycotoxins. **Feedstuffs**, v. 22, p. 12-17, 1998.

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.

STACK, R. W. A comparison of the inoculum potential of ascospores and conidia of *Gibberella zeae*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, p. 137-142, 1989.

STUMPF, R. **Prevalência, perfil toxicogênico e virulência de espécies de *Fusarium* associados aos grãos de milho no Estado do Rio Grande do Sul**. 2011, 119 f (Dissertação, mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WILKE, A. L.; BRONSON, C. R.; TOMAS, A.; MULKVOLD, G. P. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v. 91, p. 1109-1115, 2007.

WILKE, A. L.; BRONSON, C. R.; TOMAS, A.; MULKVOLD, G. P. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v. 91, p. 1109-1115, 2007.

WOLF, M. J.; BUZAN, C. L.; MAC-MASTER, M. M.; RIST, C. E. Structure of mature corn kernel. II. Microscopic structure of pericarp, seed coat, and hilar layer of dent corn. **Cereal Chem**, v. 29, p. 334-338, 1952.

ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LESLIE, J. F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp.nov. from prairie grasses, a new species in *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 95, p. 943-954, 2003.



## CAPÍTULO II

---

**Isolados de *Fusarium verticillioides* potencialmente produtores de fumonisinas associados a grãos de milho no Nordeste do Brasil**

**Artigo submetido à Tropical Plant Pathology**

1 **Isolados patogênicos de *Fusarium verticillioides* potencialmente produtores de**  
2 **fumonisina associados a grãos de milho no Nordeste do Brasil**

3

4 **Maruzanete P. Melo<sup>1</sup>, Cristiano S. Lima<sup>2</sup>, José Emanuel S. Azevedo<sup>2</sup> & Dauri José**  
5 **Tessmann<sup>3</sup>**

6 <sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, 37200-000, Lavras, Brasil.

7 <sup>2</sup>Unidade acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 55395-190,

8 Garanhuns, PE, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias ,

9 Departamento de Agronomia, Av. Colombo, Maringá-PR, Brasil.

10 Autor para correspondência: Cristiano S. Lima, email: Cristiano@uag.ufrpe.br

11 **Resumo**

12 Os agentes de podridões de milho são diversos sendo que o grupo que merece destaque são as  
13 espécies de *Fusarium*, grande parte dessas espécies encontra-se dentro do complexo  
14 *Gibberella fujikuroi*. Os sintomas iniciais das podridões é a presença de uma coloração rosada  
15 na espiga ou na sua base. Os grãos afetados apresentam coloração que variam de rosado, rosa-  
16 salmão a avermelhada ou marrom escuro no estado avançado de podridão. Este estudo  
17 objetivou identificar as espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de fumonisinas em  
18 grãos de milho de procedência do Nordeste brasileiro. Foram, avaliadas as características  
19 morfológicas, molecular, biológica e de patogenicidade. De um total de 35 isolados utilizados  
20 no teste de patogenicidade, todos foram patogênicos, sendo que 33 isolados apresentaram  
21 colonização sistêmica e 2 colonização localizada. Em Relação à caracterização morfológicas,  
22 90% apresentaram características morfológicas de *F. verticillioides*, com a predominância de  
23 microconídios em longas cadeias, a coloração dos isolados variaram de branco, salmão,

24 violeta e alaranjado. Na análise biológica (indução sexual), utilizando testadores biológicos de  
25 *F. verticillioides*. De um total de 95 isolados de procedência do Agreste Pernambucano, 72  
26 isolados foram férteis como fêmeas e 32 como hermafroditas. 190 isolados foram  
27 caracterizados moleculamente, com a utilização de *primers* específico, 142 desde foram  
28 confirmado como *F. verticillioides*. Seleccionaram 120 isolados de *F. verticillioides*, para  
29 quimiotipagem, 87 isolados apresentaram o gene VERTF e 49 o gene FUM 53F. Pesquisa,  
30 realizada no Rio Grande do Sul confirmaram alta frequência de ambos os genes para *F.*  
31 *verticillioides*.

32

### 33 **Introdução**

34 O Brasil é o terceiro produtor mundial de grãos de milho (*Zea mays* L.), ficando atrás  
35 dos Estados Unidos e China. Utilizado extensivamente na alimentação humana e ração  
36 animal. Esta é uma cultura de importância econômica e social produzido em praticamente  
37 todas as regiões do Brasil, sobretudo Nordeste onde é considerado alimento básico da  
38 população, sendo fonte de energia para muitas pessoas que vivem no semi-árido. Pela sua  
39 versatilidade de uso, é um dos mais importantes produtos do setor agrícola no Brasil (Castro  
40 et al, 2009).

41 Doenças em milho ocasionadas por espécies de *Fusarium* ocorrem mundialmente,  
42 acarretando vários danos (Ares et al, 2004), significativas perdas em campo (Logrieco et al,  
43 2002) além de perda da qualidade dos produtos em decorrência da contaminação com  
44 micotoxinas (Wu, 2007). Dentre todos os produtos agrícolas, o milho é o que apresenta os  
45 mais altos níveis de contaminação por micotoxinas produzidas por *Fusarium* (Munkvold,  
46 2003).

47           As espécies *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium subglutinans*  
48 são agentes causais de doenças em plântulas, raiz, colmo, espiga e em grãos de milho.  
49 Infecções assintomáticas podem ocorrer em toda planta e a transmissão do patógeno via  
50 semente, poderá acarretar infecções sistêmicas que irão posteriormente afetar os grãos.  
51 (Munkvold & Desjardins, 1997).

52           As micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium* incluem representantes dos  
53 tricotecenos, zearalenona e fumonisinas. Diversos trabalhos realizados no Brasil e no mundo  
54 relatam um grande número de amostras de milho contaminadas com micotoxinas, sendo as  
55 fumonisinas as de maior ocorrência (Kawashima & Soares, 2006). A produção destes  
56 metabólicos é influenciada por fatores biológicos, químicos e físicos. Dentre os biológicos  
57 destacam-se a virulência do patógeno e a susceptibilidade do hospedeiro. Como fator  
58 químico, destaca-se o uso de fungicidas, que ao atuarem controlando a doença contribuem  
59 para a diminuição na contaminação por micotoxinas. Entre os fatores físicos temos a  
60 temperatura, umidade, infestação por insetos e armazenamento (Ramos, 2008). A presença de  
61 fumonisinas em milho tem sido relacionada ao câncer de esôfago em habitantes na zona de  
62 Transkei, África e China (FAO, 2003), edema pulmonar em suínos (Colvin & Harrison, 1992)  
63 e em eqüinos causa leucoencefalomalácia (Brabet et al., 2005).

64           A taxonomia de fungos baseada em critérios morfológicos está sofrendo mudanças  
65 apoiadas em resultado da aplicação de técnicas moleculares na caracterização de populações e  
66 na reconstrução das relações filogenéticas entre as espécies. O gênero *Fusarium* é um  
67 exemplo que ilustra o crescente número de espécies ainda em descoberta ou sendo  
68 reconhecidas. A maioria dos fitopatologistas estão familiarizados com a controvérsia  
69 taxonômica desse gênero e com os diferentes conceitos aplicados no reconhecimento de  
70 espécies, que explicam em parte a disparidade em número de espécies no período de 1935 a  
71 1983. Três complexos de espécies são os exemplos mais específicos dessa mudança. O

72 complexo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenn, o complexo *Fusarium solani* (Mart) Sacc e  
73 o complexo *F. graminearum* (Seifert, 2006).

74 As espécies de *Fusarium* patogênicas e produtoras de micotoxinas em milho estão  
75 contidas no complexo *G. fujikuroi*, o qual encerra grande parte das espécies da Seção *Liseola*.  
76 Estas espécies eram identificadas como *Fusarium moniliforme* J. Sheld. até a década de 1990.  
77 Porém, com os estudos de filogenia com base na análise de genes (O'Donnell et al., 1998;  
78 2000) e os estudos de compatibilidade sexual (Leslie & Summerell, 2006), esta morfo-  
79 espécie foi subdividida em várias espécies biológicas e ou filogenéticas. Dentre estas  
80 espécies, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, ocorrem comumente em milho,  
81 sendo a primeira a mais freqüente. Em 2003, os principais pesquisadores no gênero *Fusarium*  
82 publicaram uma nota ressaltando a importância social, científica e econômica de não se  
83 utilizar mais o nome *F. moniliforme* (Seifert et al 2003).

84 A identificação de espécies de *Fusarium* envolve conceitos de caracterização  
85 morfológica, baseada na similaridade de fatores denominados morfológicos; de espécie  
86 morfológica, baseada na similaridade dos caracteres morfológicos; a de espécie biológica,  
87 baseada na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie; e o conceito de espécie  
88 filogenética, baseada na análise de seqüências gênicas (O'Donnell et al., 2000; Summerell et  
89 al. 2003; Leslie & Summerell, 2006). O reconhecimento de espécies de *Fusarium*,  
90 especialmente as que ocorrem associadas ao milho, realizado somente pelas características  
91 morfológicas não é suficiente, podendo levar à identificação errônea quando utilizado como  
92 único critério. Isto decorre da grande plasticidade e similaridade dos marcadores morfológicos  
93 entre as espécies, sendo necessário o emprego de técnicas complementares como métodos  
94 moleculares e cruzamentos, para as espécies que têm fase sexuada, e o uso de protocolos  
95 baseados em PCR, que utilizam *primers* específicos, para a identificação de *F. verticillioides*,  
96 *F. proliferatum* e *F. subglutinans* (Mulè et al., 2004; Leslie & Summerell, 2006).

97           Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo identificar as espécies de  
98 *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas associadas à grãos de milho no Nordeste  
99 do Brasil, por técnica de PCR, cruzamentos com isolados testadores de espécies biológicas e  
100 complementação com caracteres morfológicos, seguido da identificação de gene codificante  
101 para fumonisinas das espécies de *F. verticillioides* e teste de patogenicidade em plantas de  
102 milho.

103

## 104 **Material e Métodos**

### 105 **Coleta das amostras**

106           Foram analisadas 50 amostras, com grãos assintomáticos, compostas de  
107 aproximadamente de 1 Kg cada, obtidas da safra 2009/2010/2011, foi obtido, sendo cada  
108 amostra de aproximadamente 1 kg. Procedentes dos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará,  
109 Maranhão, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Piauí. As mesmas foram armazenadas em  
110 saco de papel e acondicionadas a 4°C até o isolamento de *Fusarium*.

### 111 **Teste de sanidade**

112           Cem grãos de cada amostra foram selecionados ao acaso e desinfestados com álcool  
113 etílico a 70% e hipoclorito de sódio a 2%. Em seguida, dispostos de maneira equidistante em  
114 placas de Petri contendo três folhas papel de filtro autoclavado e umedecido com água  
115 destilada e esterilizada e incubadas em bancada à temperatura ambiente (23 a 28°C). Após  
116 24h de incubação, as sementes foram colocadas em freezer -20 °C por 24h e finalmente  
117 depositadas à bancada para incubação por mais oito dias.

118

### 119 **Isolamento de *Fusarium* spp.**

120 O isolamento foi realizado à partir de grãos com crescimento de aspecto cotonosa.  
121 Fragmentos de micélio característicos de *Fusarium* foram transferidos para meio batata-  
122 dextrose-ágar (BDA), utilizando-se uma agulha metálica previamente esterilizada. As placas  
123 foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12h por sete  
124 dias. De cada isolado realizou-se preparação microscópica, para confirmar se o referido fungo  
125 se tratava de *Fusarium*.

126 Para obtenção de culturas monospóricas, porções do isolamento fúngico em BDA  
127 foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de água destilada e esterilizada e agitada  
128 em vórtex. Uma pequena alíquota foi transferida para meio ágar-água e espalhada com uma  
129 alça de Drigalski. Após 24 h as placas foram observadas em microscópio estereoscópio,  
130 retirando conídio com a presença de um tubo germinativo, tranferindo-o para meio BDA,  
131 seguido de incubação em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h por sete dias.

### 132 **Preservação dos isolados e Caracterização morfológica**

133 Os isolados obtidos neste estudo foram preservados em água destilada esterilizada a 10  
134 °C (Castellani, 1939) na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Profa. Maria  
135 Menezes” - CMM, do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Setor de Fitossanidade,  
136 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE.

137 A caracterização morfológica dos isolados foi realizada de acordo com Lima et al  
138 (2009), sendo estes cultivados nos meios BDA e ágar pobre em nutrientes (SNA). O BDA, foi  
139 utilizado para avaliação da taxa de crescimento micelial e a pigmentação da colônia. Para  
140 determinação da taxa de crescimento micelial, um disco de micélio foi transferido para o  
141 centro de uma placa de Petri contendo BDA, seguido de incubação a 25°C no escuro, por três

142 dias. Após esse período foram tomadas medições do diâmetro ortogonal das culturas  
143 crescidas. Para a avaliação da pigmentação da colônia um disco de micélio foi transferido  
144 para o centro de uma placa de Petri contendo BDA, seguido de incubação a 20°C com  
145 fotoperíodo de 12 h de luz branca mais luz negra e 12 h no escuro, por 10 a 14 dias.

146 Em SNA foram observados características micromorfológicas, com fragmentos secos  
147 e esterilizados de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). Após 10 a 14 dias de incubação  
148 a 20°C, fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente mais luz negra e 12 horas no  
149 escuro, registrou-se a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e  
150 origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides, presença ou não de  
151 clamidósporos, presença ou não de microgonídios em falsas cabeças.

#### 152 **Extração de DNA, identificação das espécies por PCR e amplificação de gene codificante** 153 **das fumonisinas**

154 A extração do DNA genômico dos isolados de *Fusarium* obtidos neste estudo foi  
155 realizada utilizando-se o kit “AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep”, fornecido pela  
156 empresa Axygen Biosciences, Union City, CA, Estados Unidos. A biomassa para extração de  
157 DNA foi produzida por meio da inoculação de suspensão de esporos em 4 mL do meio água  
158 pobre em nutrientes (SNA sem ágar) + 1 mL do complexo vitamínico Revitan® (SNV), em  
159 tubo de ensaio de vidro de 10 x 1,6 cm. A incubação foi realizada com agitação manual (2  
160 vezes ao dia), por três dias a 25°C, período após o qual a biomassa foi transferida para um  
161 microtubo de 1,5 mL utilizando-se uma pipeta automática de 1000 µL de capacidade com a  
162 extremidade da ponteira cortada. A amostra foi centrifugada a 10.000xg por 1 min, para  
163 formação de precipitado e sobrenadante. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado,  
164 ficando apenas o precipitado (biomassa fúngica). Ao final da extração de DNA, as amostras  
165 foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR Safe,



166 Invitrogen Brasil, e a quantificação e mensuração do tamanho do DNA genômico foram  
167 realizadas por comparação de altura e intensidade de banda com o marcador 1 Kb Ladder  
168 (Invitrogen, Brasil). As imagens do DNA genômico no gel foram capturadas com o sistema  
169 Gel Logic 112 (Kodak), acoplado a um transiluminador UV. A concentração de DNA  
170 genômico foi ajustada para 4-20 ng.µL<sup>-1</sup>.

171 A identificação dos isolados foi realizada utilizando-se o protocolo de PCR de Mulè et  
172 al (2004), com os *primers* VER1(5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3') e VER2 (5'-  
173 AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3'), para *F. verticillioides*, e PRO1 (5'-  
174 CTTTCCGCCAAGTTTCTTC-3') e PRO2 (5'-TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG-3') para  
175 *F. proliferatum*. O primeiro par de *primers* amplifica um fragmento de 578 pb e o segundo  
176 amplifica um fragmento de 585 pb do gene da calmodulina. A reação em cadeia da  
177 polimerase (PCR) para cada isolado conteve um volume total de 20 µL, com as seguintes  
178 concentrações finais dos reagentes: Tampão da PCR (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM  
179 de cada dNTP), Primers (15 pmol de cada primer), Taq DNA polimerase (0,5 U por reação) e  
180 DNA genômico (4-20 ng). A PCR foi realizada utilizando-se as seguintes condições:  
181 desnaturação a 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 50 s, anelamento a 56°C  
182 por 50 s, extensão a 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 7 min, seguido de refrigeração  
183 a 4°C até a retirada das amostras do termociclador (modelo MasterCycler, Eppendorf). A  
184 visualização do resultado da PCR foi feita como citado anteriormente para o DNA genômico.

185 A amplificação de parte de gene envolvido na produção de fumonisinas foi realizada  
186 utilizando-se o protocolo de PCR de Patiño et al (2004), com os *primers* VERTF-1(5'-  
187 GCGGGAATTCAAAAGTGGCC-3') e VERTF-2 (5'-GAGGGCGCGAAACGGATCGG-  
188 3'), e de Sanchez-Rangel et al (2005), com os *primers* FUM53F (5'-  
189 CTTGAACGCGGAGCTAGATTAT-3') e FUM53R (5'-  
190 ATCCGTGTATGCATATGTTCGAG-3'). O primeiro par de *primers* amplifica um fragmento

191 de 400 pb do gene FUM5/FUM8, e o segundo amplifica um fragmento de 354 pb do gene  
192 FUM1. A reação em cadeia da polimerase (PCR) para cada isolado conteve um volume total  
193 de 20 µL, com as seguintes concentrações finais dos reagentes: Tampão da PCR (1X), MgCl<sub>2</sub>  
194 (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM de cada dNTP), Primers (15 pmol de cada primer), Taq DNA  
195 polimerase (0,5 U por reação) e DNA genômico (4-20 ng). A PCR foi realizada utilizando-se  
196 Para os primers VERTF-1/VERTF-2: A PCR foi realizada nas seguintes condições:  
197 desnaturação a 94°C por 1 min e 25 s; 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 s, anelamento  
198 a 62°C por 20 s, extensão a 72°C por 45 s; extensão final a 72°C por 5 min, seguido de  
199 refrigeração a 4°C até a retirada das amostras do termociclador (modelo MasterCycler,  
200 Eppendorf). Já para os primers FUM53F/FUM53R, as condições da PCR foram: desnaturação  
201 a 94°C por 3 min; 27 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento a 56°C por 40 s,  
202 extensão a 72°C por 40 s; extensão final a 72°C por 7 min, seguido de refrigeração a 4°C até a  
203 retirada das amostras do termociclador (modelo MasterCycler, Eppendorf). A visualização do  
204 resultado da PCR foi feita como citado anteriormente para o DNA genômico.

#### 205 **Cruzamentos com testadores de *Gibberella moniliformis***

206 Para avaliar a taxa de fertilidade de isolados do Agreste de Pernambuco, isolados  
207 testadores de *Gibberella moniliformis* Wineland de tipos opostos com *mating types*  
208 conhecidos (KSU 00149 MATA-1 e KSU 00999 MATA-2) foram cruzados com isolados  
209 obtidos do campo. Os isolados do parental masculino (isolados do campo) foram cultivados  
210 em tubo de ensaio contendo BDA com 1 mL de polivitaminico Revitam<sup>®</sup>, enquanto que os  
211 hermafroditas (testadores) foram cultivados em placas de Petri (60x15 mm) contendo meio  
212 cenoura-ágar. A incubação foi realizada a 20-22 °C sob 12h de luz fluorescente combinada  
213 com luz negra e 12h de escuro por 7 dias. Após este período obteve-se uma suspensão de  
214 esporos do parental masculino, pela adição de 2 mL de solução de Tween 80 a 2,5%. Sendo a  
215 liberação dos esporos feita pela fricção da superfície da colônia. Em seguida, a suspensão foi

216 adicionada à superfície da colônia do parental feminino. Com uma alça de Drigalski,  
217 espalhou-se a suspensão de forma uniforme para umedecer o micélio. O papel dos parentais  
218 foi invertido posteriormente em cruzamentos recíprocas e os isolados que produziram  
219 cruzamentos férteis (com exsudação de um cirro de ascósporos), quando utilizado como  
220 parental masculino e feminino, foram considerados hermafroditas (Leslie & Summerell,  
221 2006).

### 222 **Teste de patogenicidade**

223 Os testes para de patogenicidade em colmo de milho foram realizados segundo o  
224 protocolo de Damicone et al. (1988) com algumas adaptações. Sementes previamente  
225 submetidas a desinfestação ou termoterapia foram semeadas em vasos perfurados com a  
226 capacidade de 1 L, contendo solo do tipo (latossolo amarelo distrocoeso húmico, textura  
227 argilosa). A desinfestação foi feita pela imersão das sementes em álcool 70% por 30s, solução  
228 de hipoclorito de sódio 1% por um min e enxágüe duplo com água destilada. O tratamento  
229 termoterápico seguiu a metodologia de (Coutinho et al., 2007) em que as sementes foram  
230 imersas em água quente (60°C) por um período de 10 min. e secas em papel filtro em câmara  
231 de fluxo laminar por duas horas. Após semeadura os vasos, cada um contendo duas sementes  
232 a 1 cm de profundidade, foram mantidos em casa de vegetação e distribuídos ao acaso sobre  
233 bancadas. A avaliação da patogenicidade dos isolados de *Fusarium* foi determinada pela  
234 inoculação do colmo de plantas de milho, pelo emprego de palitos de dentes esterilizados,  
235 após o contato de uma das pontas com a superfície do meio para retirada de um pouco de  
236 micélio. A inoculação foi realizada em plantas de milho, 20 dias após a germinação, pela  
237 inserção das pontas dos palitos que continham estruturas fúngicas. A perfuração do colmo foi  
238 a aproximadamente 1 cm da linha do solo e os palitos foram mantidos no local por um  
239 período de 48 h. Dez dias após inoculação procedeu a avaliação. O delineamento  
240 experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições por tratamento, sendo cada

241 repetição constituída de um vaso com duas plantas. No total, foram avaliados 36 tratamentos,  
242 sendo 35 isolados e uma testemunha não inoculada. Os isolados para teste de patogenicidade  
243 foram selecionados baseados nas características de coloração em BDA, taxa de crescimento  
244 micelial e pela estruturas formadas em SNA.

245

## 246 **Resultados e Discussão**

247 De 190 isolados analisados por critérios morfológicos, 150 foram identificados como  
248 sendo *F. verticillioides*. Já através de critérios moleculares, *primers* específico VER 1/2 houve  
249 amplificação de 142 isolados.

250 A predominância de espécies de *F. verticillioides* confirma resultados (Munkvold,  
251 2003), que rela *F. moniliforme*, posteriormente denomino *F. verticillioides*, é a espécie  
252 dominante associada à podridão da base da espiga, juntamente com *F. proliferatum* e *F.*  
253 *subglutinans*.

254 Rahjoo et al (2008), em estudos realizados no Irã, obtiveram uma população de 191  
255 isolados, 140 dos quais confirmados como *F. verticillioides*, com base nas características  
256 morfológicas. Segundo o autor, a identificação morfológica pode não ser suficiente para  
257 identificar espécies de *Fusarium*, especialmente quando se trata do complexo *G. fujikuroi*.  
258 Algumas espécies desse complexo são muito similares, podendo ser identificadas  
259 erroneamente. *F. verticillioides* e *F. thapsinum* são muito similares, ambos produzem  
260 microconídio em longas cadeias.

261 Estudo realizado por Querales, (2010), em 18 amostras de sementes de milho híbridos  
262 coletados nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato  
263 Grosso do Sul da safra 2001 a 2006. Obteve-se 100 isolados, com a utilização de *primers*

264 específicos, sendo que destes noventa e três isolados amplificaram para *F. verticillioides*,  
265 quatro para *F. proliferatum* e dois *F. subglutinans* e um como *Fusarium* sp.

266       Trabalhos, recentes realizados na Argentina, Sampietro et al (2010) apresentaram  
267 incerteza em 30% das identificações morfológicas realizadas para determinação de isolados  
268 do complexo *Gibberella fujikuroi*.

269       Doenças em milho causadas por espécies de *Fusarium* ocorrem mundialmente,  
270 causando vários danos Ares et al, (2004), significativas perdas em campo Logrieco et al,  
271 (2002) e perda da qualidade dos produtos colhidos através da contaminação com micotoxinas  
272 Wu (2007). De todos os produtos agrícolas, milho é o que mostra altos níveis de  
273 contaminação por micotoxinas produzidos por *Fusarium* Munkvold (2003)

274       Stumpt (2011) ao realizar levantamento de *Fusarium* associado a grão de milho no Rio  
275 Grande do Sul, obteve uma população de 304 isolados de *Fusarium* spp, sendo três do  
276 complexo *Gibberella fujikuroi* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*) e *F.*  
277 *graminearum*. Dessa população 264 isolados foram identificados como *F. verticillioides*, 21  
278 como *F. graminearum*, quatro de *F. subglutinans* e dois isolados *F. proliferatum*.

279       Observa-se em grande parte dos trabalhos realizados com o patossistema milho x  
280 *Fusarium* spp, existe uma predominância de *F. verticillioides*, isto provavelmente é em  
281 função de tratar-se de um patógeno com ampla distribuição geográfica, específico do milho,  
282 causando podridão do colmo e espiga resultando em significativas perdas no campo Leslie &  
283 Summerell (2006).

284       Já no México Rodrigues-Moralez et al (2007), obtiveram uma alta diversidade de  
285 espécies de *Fusarium* associadas a cultura do milho. Dentre estas destacam *F. verticillioides*,  
286 *F. poae*, *F. subglutinans*, *F. solani*, *F.napiforme* e *F. pseudonygamai*. Provavelmente, esta

287 diversidade de espécie é em função da coevolução *Zea mays* L e *Fusarium* spp, uma vez que  
288 o milho possui seu centro de origem na região do México.

289 Na Suíça (Dorn et al, 2009), obtiveram um grande número de espécies de *Fusarium*  
290 associado a grãos e colmos, totalizando 5620 isolados. Desse total 2385 obtidos de grãos e  
291 3235 de colmos. Nos grãos *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F.*  
292 *subglutinans* e *F. crookwellense* foram as espécies predominantes. A ocorrência de *F.*  
293 *crookwelense* e *F. subglutinans* com uma significativa prevalência foi favorecida,  
294 provavelmente, por de regiões temperadas. Para os isolados obtidos do colmo *F. equiseti*, *F.*  
295 *verticillioides*, *F. graminearum*, *F. crookwellense* e *F. subglutinans* foram as mais  
296 prevalentes. A possível explicação pela prevalência da maior incidência de *Fusarium equiseti*  
297 no colmo, provavelmente é em função de tratar-se de um patógeno cosmopolita, seguido de  
298 características de saprofitismo e invasor secundário Leslie & Summerell (2006).

299 Para um número de 120 isolados de *F. verticillioides* obtidos de grãos assintomáticos  
300 48 apresentaram o gene FUM, sendo a PCR realizada com *primers* FUM 53 R/F e 83  
301 amplificaram quando utilizou-se o *primer* VERT F. A não amplificação dos outros isolados  
302 foi provavelmente em função do baixo rendimento na extração de DNA. A primeira pesquisa  
303 realizada no Brasil, quanto à presença do gene FUM5 foi realizado por Otoni (2008), onde  
304 observou a presença do gene em 80% das avaliações, sendo a frequência dos isolados que  
305 tiveram identificação positiva variou de safras e anos. Esta variação pode ser atribuída à  
306 interferência dos fatores ambientais na biossíntese.

307 Pelas características morfológicas 95% dos isolados formaram microconídios em  
308 cadeias longas e em falsas cabeças. Pela descrição de Leslie & Summerell (2006),  
309 *F. verticillioides* produz microconídios em cadeias longas, não sendo observado “falsa cabeça”  
310 para a referida espécies. Portanto, Querales (2010), contrariamente observou que de 100

311 isolados de *Fusarium* spp, setenta e sete produziram em SNA microconídios em cadeias  
312 longas e em “falsa cabeça”, em estudos utilizando critérios moleculares os mesmos setenta e  
313 sete isolados foram identificados como *F. verticillioides*.

314 Em relação à formação de macroconídios apenas cinco isolados produziram  
315 esporodóquios com coloração alaranjada. Os macroconídios apresentaram formato falcado  
316 com 3-5 septos. Segundo Leslie & Summerell, (2006) a ausência da formação de  
317 esporodóquios é uma característica do complexo de espécies *Gibberella fujikuroi*, seguido do  
318 número de septos do macroconídio e coloração do esporodóquios. Nenhum dos isolados  
319 apresentaram presença de clamidósporos, estrutura presente nas espécies *F. nygamai*, este  
320 patógeno foi identificado como agente causal de lesões em raízes de sorgo, mas também  
321 podem ser obtido de algodão, milho, gramas nativas, arroz e solo Leslie & Summerrel,  
322 (2006). Provavelmente, *F. nygamai*, pode ser confundido com *F. oxysporum*, espécie esta  
323 pertencente à seção *Elegans*. No entanto, *F. nygamai*, pode ser distinguido pela formação de  
324 microconídios apenas em “falsa cabeça” e formação de clamidósporos únicos ou em pares,  
325 mas nunca em cadeias Burgess & Trimboli (1986).

326 Segundo Querales (2010), é necessária a combinação de diferentes critérios para  
327 identificação de espécies do gênero *Fusarium*, principalmente quando se trata do complexo de  
328 espécie *Gibberella fujikuroi*.

329 Dos 35 isolados utilizados nas inoculações, todos foram patogênicos, com evidência  
330 de coloração amarronzada no centro do colmo, trinta e três apresentaram colonização  
331 sistêmica (Fig 1. B-C) e dois apresentaram colonização localizada (Fig. D). Para os isolados  
332 CMM 3378 e CMM 3321 foram observado presença de estrias marron à vermelha nas folhas  
333 (Fig 1.E). O isolado CMM 3324 além de possuir colonização sistêmica, teve a capacidade de  
334 causar podridão-mole n medula do colmo (Fig 1. H). O re-isolamento do patógeno confirmou

335 que os sintomas eram ocasionados pelas espécies inoculadas. Está característica de  
336 sistematicidade já foi confirmada em sementes, raízes, colmo e espigas por diversos autores  
337 Brown et al (2001), Munkvold & Carlton (1997), Munkvold et al (1997), Reid et al, (2002) e  
338 Yates et al (1999).

339 De uma população de 95 isolados de procedência do Agreste pernambucano, obteve-se  
340 72 cruzamentos férteis de fêmea estéreis e 32 cruzamentos de hermafroditas. A partir de uma  
341 semana após o cruzamentos observaram os primeiros sinais de protoperitécios de coloração  
342 negra sobre o meio. Ao completar 3 semanas do cruzamentos iniciaram as primeiras  
343 evidências de exsudação de cirros ascósporos de coloração amarela . Os isolados CMM 3324,  
344 CMM 3331, CMM 3434, CMM 3326, CMM 3442, CMM 3435, CMM 3376, CMM 3354 e  
345 CMM 3374 (Figs. 3), foram altamente férteis com uma intensa produção de peritécios  
346 seguido dos primeiros sinais de exsudação de ascósporos com apenas 2 semanas.

347

348

### Referências bibliográficas

349 Ares, JL; Ferro, RCA; Ramirez, LC, Gonzales, JM (2004) *Fusarium graminearum* Schwabe,  
350 a maize and stalk pathogen isolated from lodged plants in northwest Spain Spanish Journal of  
351 Agricultural Research 2: 249-252.

352

353

354 Brabet C, Salay E, Silva OF, Alves AF, Machinski Junior N, Vargas EA, Rozis NZ (2005)  
355 Gestão integrada de micotoxinas na cadeia produtiva de milho destilado a alimentação de  
356 frangos de corte no Brasil. Caderno de ciência e tecnologia 22: 439-451.

357

358

359 Brown CW, Cleveland C, Woloshuk GA and Bhatnagar D (2001). Grown inhibition of a  
360 *Fusarium verticillioides* GUS strain in corn kernels of aflatoxin-resistant genotypes. Appl.  
361 Biotchnol. Microbiol. 57: 708-711.

362

363

364 Burgess LW and Trimboli. D (1986) Characterization and Distribution of *Fusarium Nygamai*,  
365 sp. Nov. Mycologia. 78: 223-229.

366

367



- 368 Castellani, A (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical*  
369 *Medicine and Higyene*. 42: 225-226.  
370  
371
- 372 Castro, LMV, Veloso, NMM; Pereira, OJ; Oliveira, FL. Rendimento industrial e composição  
373 química de milho d alta qualidade protéicas em relação a híbridos comerciais. *Pesquisa*  
374 *Agropecuária Tropical*, Goiânia, v 39, n 3 p, 233-242, 2009.  
375  
376
- 377 Colvin BM & Harrison LR (1992) Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in  
378 swine. *Mycopathologia*. 117: 79-82.  
379  
380
- 381 Damicone PJ, Vineis PD, Manning WJ (1988) Cross-Pathogenicity of *Fusarium moniliforme*  
382 isolates from corn and asparagus. *Plant disease*. 14: 774-777.  
383  
384
- 385 Dorn B, Forrer, H-R, Schurch S and Vogelgsang S (2009) *Fusarium* species complex on  
386 maize Switzerland: occurrence, prevalence, impact and micotoxins in commercial hybrids  
387 under natural infection. 125: 51-61.  
388  
389
- 390 FAO. Micotoxinas em grãos. Disponível em:  
391 <<http://www.fao.org/wairdocs/X5012O/X5012o01.htm>>. Acesso em:28 de junho. 2011.  
392 Kawashima LM & Valente Soares LM (2006) Incidência de fumonisinas B1, aflatoxinas B,  
393 B2, G1e G2, ocrtoxina e zearalenona em produtos de milho. *Ciência e Tecnologia de*  
394 *Alimentos*, Campinas. 26: 516-521.  
395  
396
- 397 Klittich CJR, Leslie JF, Nelson EP end Marasas WFO (1997) *Fusarium thapsinum* (*Gibbrella*  
398 *thapsina*); A new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia*. 89: 643-652.  
399 Leslie JF and Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. 388p  
400  
401
- 402 Logrieco A, Mulé G, Morreti A & Bottalico A (2002). Toxicogenic *Fusarium* species and  
403 micotoxins with maize ear rot from Europe. *European Journal Plant Pathology* 108 : 597-609.  
404  
405
- 406 Mulè G, Susca A, Stea G and Moretti A (2004) A species-specific PCR assay based on the  
407 calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F.*  
408 *subglutinans*. *European Journal Plant Pathology* 110: 495-502.  
409  
410
- 411 Mulkvold GP, Helmich RL and Showers WB (1997) Reduced *Fusarium* ear rot and  
412 symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer  
413 resistance. *Phytopathology*. 87: 1071-1077.  
414  
415

- 416 Mulnkvold GP and Carlton WM (1997). Influence of inoculation method on systemic  
417 *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seed. Plant Disease. 81:  
418 209-217.  
419
- 420 Munkvold GP (2003) Cultural and genetic approaches to managing micotoxins in maize.  
421 Annual Review of Phytopathology 41: 99-116.  
422
- 423 Munkvold, GP & Desjardins, AE. (2006) Fumonisin in corn. Can we reduce their  
424 occurrence? Plant disease 81: 556-560
- 425 O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E (2000) A multigene phylogeny of the  
426 *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct  
427 species. Mycoscience. 41: 61-78.  
428  
429
- 430 Ottoni RJ. Análise da incidência de *Fusarium* spp. Toxicogênico e de níveis de fumonisinas  
431 em grãos ardidos de milho híbrido. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-  
432 Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba.  
433  
434
- 435 Patiño B, Mirete S, González-Jaén MT, Mulé G, Rodríguez MT, Vázquez C (2004) PCR  
436 detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. Journal of Food  
437 Protection, v. 67, p. 1278-1283.  
438  
439
- 440 Pereira OAP, Carvalho RV, Camargo ALE (2005) Doenças do milho (zea mays) in: Kimati  
441 H, Amorin L, Resende MJA, Bergamin, FA, Camargo, ALE. Manual de Fitopatologia cap 55:  
442 477-488.  
443  
444
- 445 Querales, P. Identificação morfológica e genética de *Fusarium* spp isolados de sementes e  
446 associado a podridão do colmo do milho (*Zea mays* L). 2010. 77 p Tese (Doutorado em  
447 Ciências) . Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba,  
448 2010.  
449  
450
- 451 Rahjoo V, Zad J, Javan-Nikkahah M, Mirzadi Gohari A, Okhovvat SM, Bihamta MR,  
452 Razzaghian J and Klemsdal SS (2008) Morphological and Molecular Identification of  
453 *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. Journal Plant Pathology. 90: 463-468.  
454  
455
- 456 Ramos ATM, Levantamento da microflora de grãos ardidos de milho e avaliação da  
457 resistência genética à *Fusarium verticillioides*. Tese mestrado em fitopatologia. Universidade  
458 de São Paulo, "Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz" Piracicaba. 2008  
459  
460
- 461 Reid LM, Woldemariam MT, Zhu X, Stewart D and Schaafsma A (2002). Effect of  
462 inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium graminearum*, *F.*  
463 *verticillioides*, or *F. subglutinans* inoculated maize ears. Canadian Journal Plant Pathology.  
464 24: 162-267.  
465

- 466  
467 Sanchez-Rangel D, Sanjuan-Badillo A, Plasencia J (2005) Fumonisin production by *Fusarium*  
468 *verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain  
469 reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *Agricultural and Food Chemistry*, 53:  
470 8565-8571.  
471  
472
- 473 Scauflaire J, Gourgue M and Munaut Françoise (2011). *Fusarium temperatum* sp nov. from  
474 maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia*.  
475
- 476 Seifert KA (2006) Enhancing the relevance of fungal taxonomy to plant pathology:  
477 phylogenetics, molecular diagnostics, and long-term memory. Symposium contribution.  
478 *Canadian Journal of Plant Pathology*. 28: 280-287.  
479  
480
- 481 Seifert KA, Aoki T, Baayen RP, Brayford, D, Burgess, LW.; Chulze, S.; Gams, W.;  
482 Geiser, D.; Gruyter, DJ.; Leslie, J.F.; Logrieco, A.; Marasas, W.F.O.; Nirenberger, H.I.; O'  
483 Donnell, K.; Rheeder J.P., S Amuels G.P, Summerell, B.A, Thrane, U. Waalwijk, C. The  
484 name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research News*.  
485 Amsterdam, v 107, p 643-644. 2003.
- 486
- 487 Summerell BA, Salleh B, Leslie JF (2003) An utilitarian approach to *Fusarium* identification.  
488 *Plant Disease*. 87: 117-128.  
489  
490
- 491 Wu F (2007) Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feed. *Animal*  
492 *Feed Science and Technology* 137: 363-374.  
493  
494
- 495 Yates IEK, Hiett K, Kapczynski D, Smart W, Glenn A, Hilton DM, Bacon CW, Meinersmann  
496 R, Liu S and Jaworski A (1999) GUS transformation of maize fungal endophyte *Fusarium*  
497 *moniliforme*. *Mycol. Res* 103: 129-136.  
498  
499
- 500 Zeller KU, Summerell BA, Bullock S end Leslie JF (2003) *Gibberella konza* (*Fusarium*  
501 *konzum*) sp. Nov. from prairie grasses, a new species in *Gibberella fujikuroi* species complex.  
502 *Mycologia*. 95: 943-954.

## CAPITULO FIGURAS

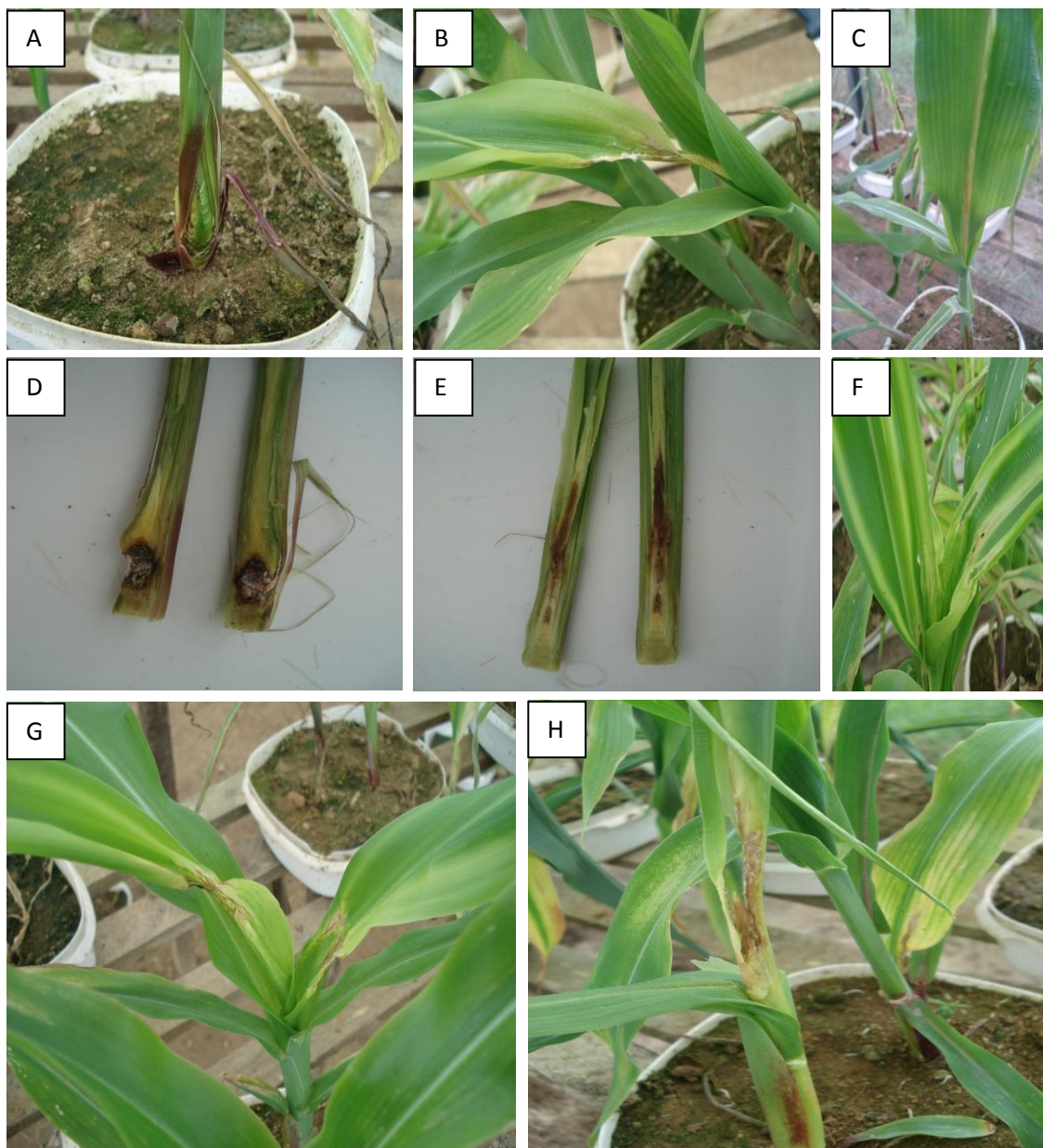


FIGURA 1. Principais sintomas resultante teste de patogenidade. A- Sintoma reflexo no ponto de inoculação, B- Seta Indicando sinais de *Fusarium verticillioides*, C- Estrias na nervura principal, colonização causada por *F. Verticillioides*, D- Colmo evidenciando colonização localizada, E- Colmo evidenciando colonização sistêmica, F- Descoloração em resposta a colonização, G- enrolamento da folha central e H- Sintomas de podridão mole .

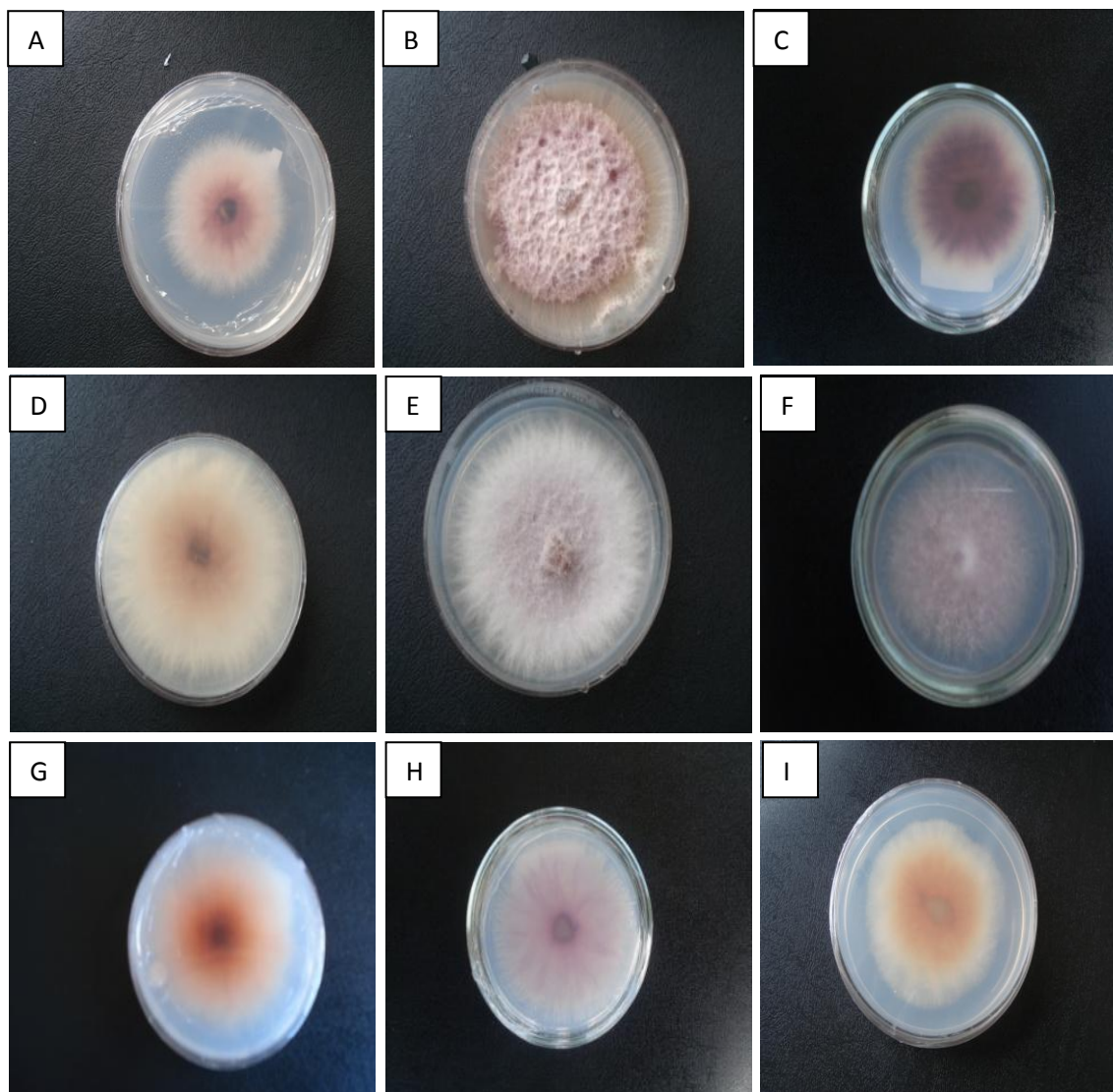


FIGURA 2: Coloração em de *Fusarium* spp realizada em BDA. A-B-G coloração Salmão, C-H coloração violeta e E- coloração branca e I Coloração alaranjada.



FIGURA 3. Resultado de cruzamentos (indução sexual) de *Fusarium verticillioides*, utilizando meio de cenoura-ágar, note estruturas de coloração negra sobre a superfície do meio, correspondente a presença de peritécios de *Gibbrella moniliformis*.

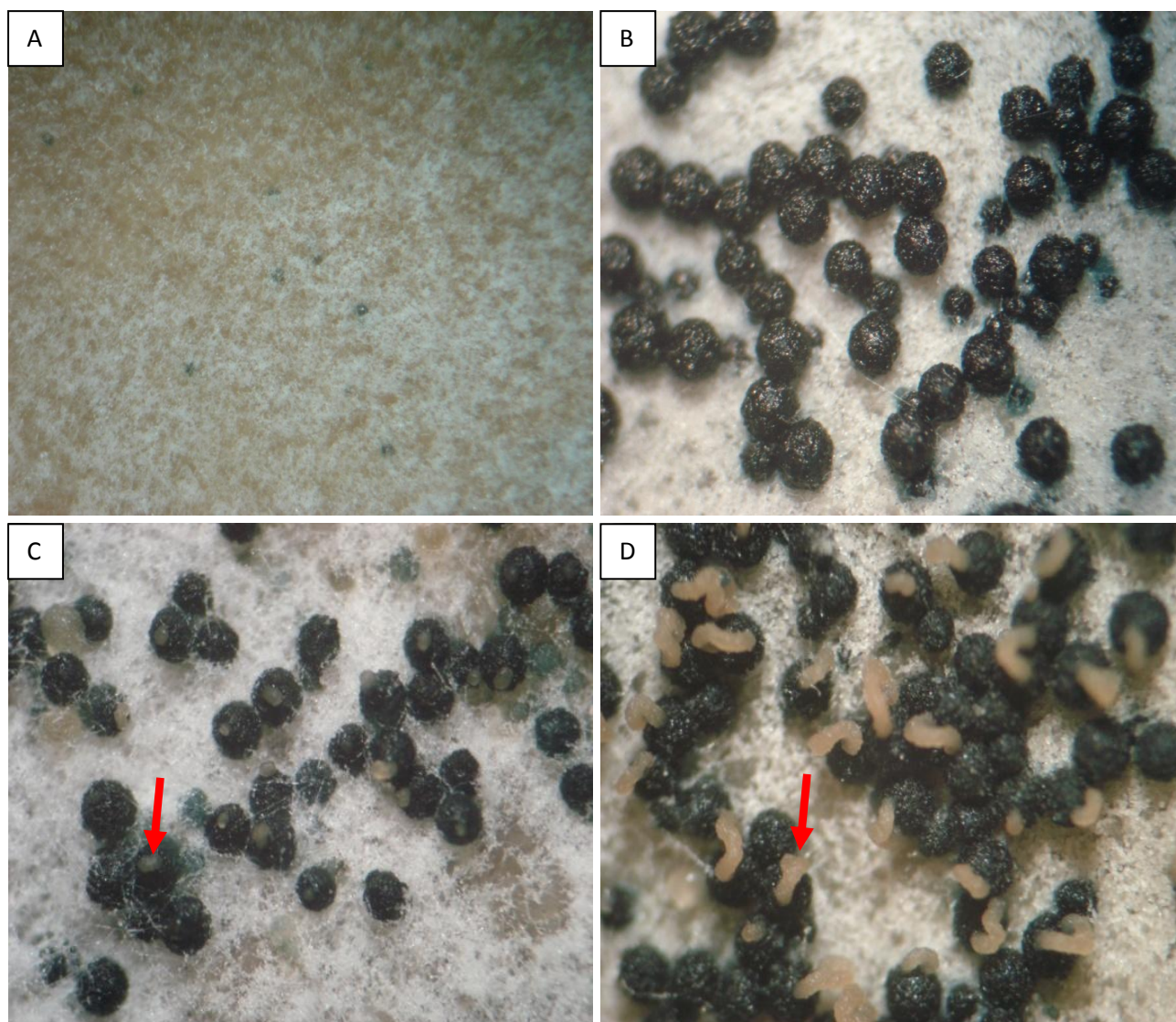


FIGURA 4: Principais eventos observados na indução sexual de *Gibberella moniliformis*. A- Presença de protoperitécios, B- Peritécios de coloração negra, C- seta indicando os primeiros sinais de exsudação de ascósporos e D- Seta indicando presença de cirros de ascósporos.

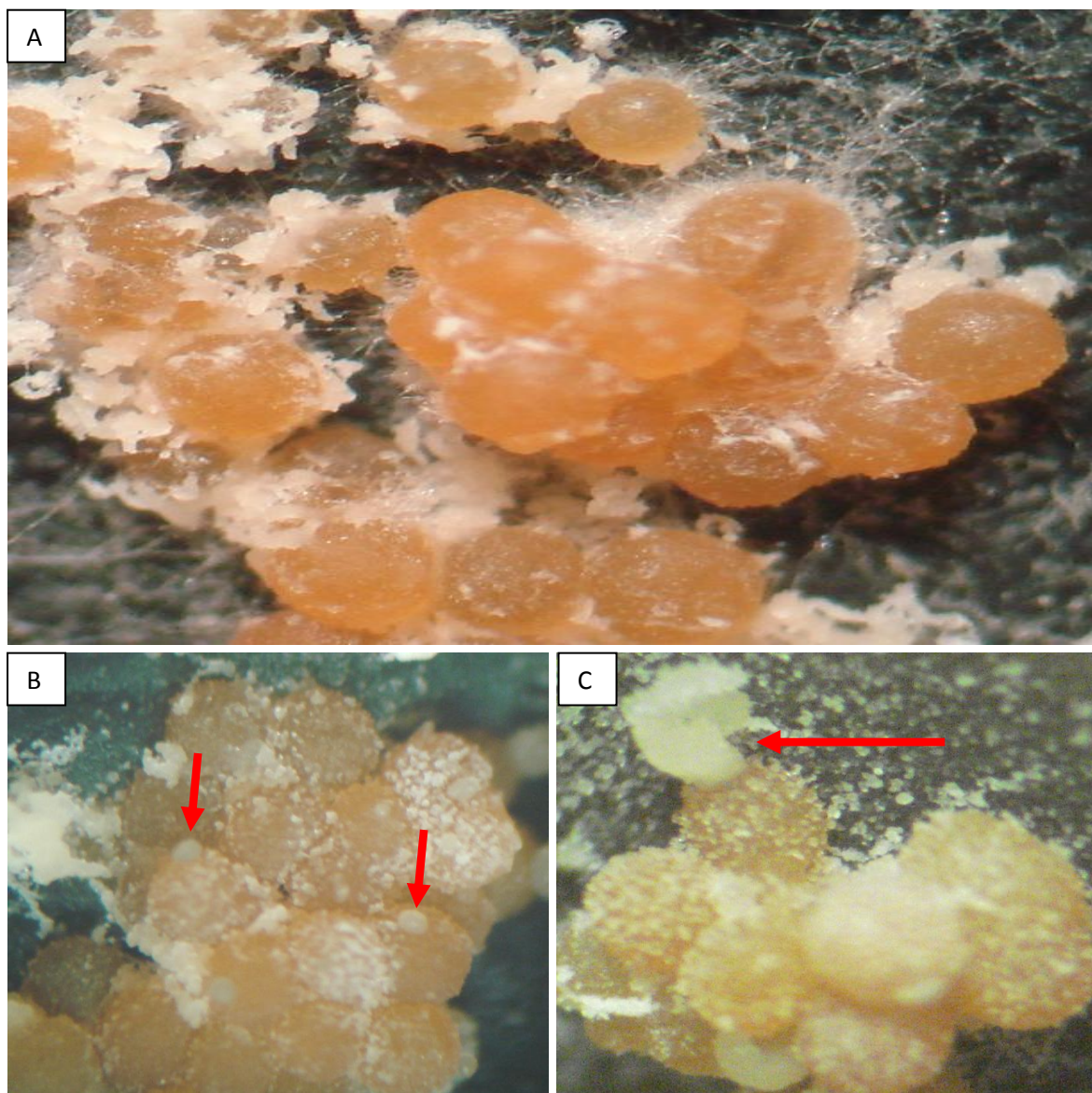


FIGURA 5: *Gibberella moniliformes* com peritécios apigmentados: A- Presença de peritécios de coloração alaranjada, B- Seta indicando primeiras evidências de exsudação e C- Seta indicando cirro de ascósporos.



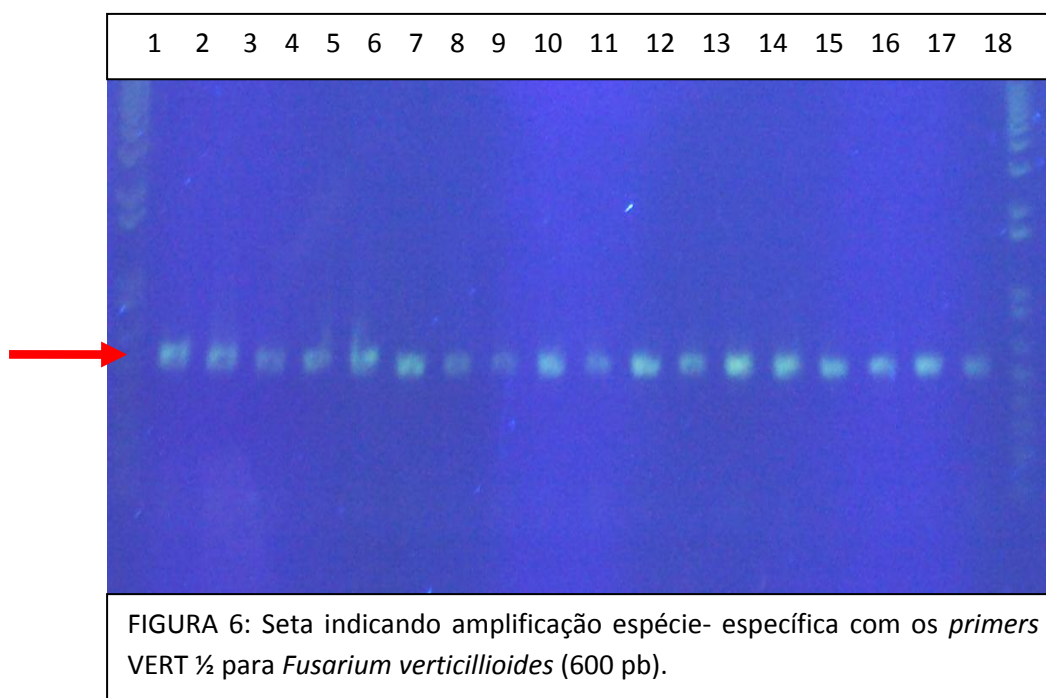


Tabela 1: Relação de isolados utilizados no estudo

ISOLADOS	MUNICÍPIO	ESTADO	ID. MOLECULAR	QUIMIOTIPAGEM	
CMM 3601	FRANCISCO SANTOS	PI	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3408	FRANCISCO SANTOS	PI	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3392	FRANCISCO SANTOS	PI	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3424	JOÃO DOURADO	PI	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3388	PICOS	PI	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3475	PICOS	PI	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3494	PICOS	PI	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3321	CAETÉS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3502	CAETÉS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3317	CAETÉS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3319	CAETÉS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3333	CAETÉS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3321	CAETÉS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3328	CAETÉS	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3332	CAETÉS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+-	-
CMM 3573	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3568	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3550	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3562	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3546	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3563	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3570	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-

ISOLADOS	MUNICIPIO	ESTADO	ID. MOLECULAR	QUIMIOTIPAGEM	
				VERT F	FUM 53F
CMM 3320	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3442	LAJEDO	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3378	SÃO JOÃO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3374	SÃO JOÃO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3598	SÃO JOÃO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3394	SÃO JOÃO	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3316	SÃO JOÃO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3591	SÃO JOÃO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3344	ANGELIM	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3363	ANGELIM	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3330	ANGELIM	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3358	ANGELIM	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3328	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3326	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3592	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3588	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3436	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3597	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3352	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3354	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3357	CANHOTINHO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3446	TERESINHA	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3587	TERESINHA	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
ISOLADOS	MUNICIPIO	ESTADO	IDEN. MOLECULAR	QUIMIOTIPAGEM	
				VERT F	FUM 53F

CMM 3323	CHÃ-GRANDE	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3324	CHÃ- GRANDE	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3327	CHÃ-GRANDE	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3314	CHÃ-GRANDE	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3377	CHÃ-GRANDE	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3329	CORRENTES	PE	F.VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3335	CORRENTES	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3349	CORRENTES	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3365	CORRENTES	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3435	CORRENTES	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3325	LAGOA OURO	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3315	LAGOA OURO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3331	GARANHUNS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3438	GARANHUNS	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3375	JUCATI	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3376	JUCATI	PE	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3517	JUCATI	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3370	CAMUÇI S. FÉLIX	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3322	VITÓRIA S' ANTÃO	PE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3456	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3517	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3526	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3464	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3462	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3514	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-

---

ISOLADOS	MUNICIPIO	ESTADO	IDEN. MOLECULAR	QUIMIOTIPAGEM	
----------	-----------	--------	-----------------	---------------	--

---

VERT F FUM 53F

---

CMM 3533	S.LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3450	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3530	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3515	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3524	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3525	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3528	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3529	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3531	S. LUIZ	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3452	BARRA CORDA	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3519	BARRA CORDA	MA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3527	BARRA CORDA	MA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3509	BARRA CORDA	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3586	BARRA CORDA	MA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3429	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3477	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3559	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3540	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3555	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3493	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3432	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3467	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3507	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3539	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3506	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-

---

ISOLADOS	MUNICIPIO	ESTADO	IDEN. MOLECULAR	QUIMIOTIPAGEM
----------	-----------	--------	-----------------	---------------

---

				VERT F	FUM 53F
CMM 3537	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3384	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3513	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3491	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3486	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3478	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3518	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3428	ED. MAGALHÃES	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3545	JUAZEIRO	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3404	JUAZEIRO	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3415	JUAZEIRO	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3511	JUAZEIRO	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3512	J. DOURADO	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3423	J. DOURADO	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3424	J. DOURADO	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3425	J. DOURADO	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	-
CMM 3425	J. DOURADO	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3426	J. DOURADO	BA	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3427	J. DOURADO	BA	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3519	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	+	-
CMM 3457	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	+	+
CMM 3459	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	-	+
CMM 3460	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
ISOLADOS	MUNICIPIO	ESTADO	IDEN. MOLECULAR	QUIMIOTIPO VERT F	FUM 53 F

CMM 3468	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3466	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3399	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3400	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3401	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3381	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3498	FORTALEZA	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3403	PENTECOSTES	CE	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3585	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3580	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3581	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3582	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3583	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3585	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3589	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3590	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•
CMM 3604	MOSSORO	RN	F. VERTICILLIOIDES	•	•

---

+ Isolados com o gene preditivo para fumonisinas

\_ Isolados sem o gene preditivo para fumonisinas

- Isolados onde não foram realizados quimiotipagem para fumonisinas

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo conclui-se que a espécie predominante no Nordeste do Brasil associadas a grãos de milho é *Fusarium verticillioides*. Todos os isolados utilizados no testes de patogenicidade foram patogênicos, com a predominância de colonização sistêmica. Alguns isolados identificados possuem o gene FUM, sendo potencialmente produtores de fumonisinas. A maior parte dos isolados de *F. verticillioides* de origem no Agreste pernambucano são do *mating type* MATA-2, sendo altamente férteis em cruzamentos com o *mating type* MATA-1. Existe uma taxa significativa de hermafroditismo na população do Agreste de Pernambuco e alta probabilidade de geração de variabilidade genética por hibridação. O isolado CMM 3316 apresentou formação de peritécios de coloração amarela, a possível hipótese é a ausência do gene de pigmentação.