

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**DIVERSIDADE, POTENCIAL TOXIGÊNICO E PATOGENICIDADE DE
ESPÉCIES DE *Fusarium* ISOLADOS EM ARROZ**

Larissa Bitencourt Gomes
Licenciada em Ciências Biológicas/ULBRA

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2014

RESERVADO PARA FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Lucas Nunes Ogliari, por toda motivação, amor e paciência.

Aos meus pais, pelos valores que me ensinaram e por sempre me motivarem a continuar em busca dos meus sonhos, muito obrigada!

Ao Professor e Orientador Emerson M. Del Ponte, pelos ensinamentos, oportunidades, amizade e dedicação desde 2009. Muito obrigada!

A minha irmã, Luana Bitencourt Gomes, pelas palavras de apoio nas horas difíceis e pela amizade verdadeira.

Aos colegas e amigos que fiz durante o período que estive nesta instituição, Ismail, Nageli, Piérri, Paulo Roberto, Felipe em especial a Leilane Silveira D'ávila e Camila P. Nicolli pelo companheirismo nos momentos bons e ruins.

À minha coorientadora, Eliana Badiale Furlong, e suas alunas pela atenção dada no período que estive na FURG.

Ao pesquisador Dr. Todd Ward pela contribuição nas análises moleculares.

Ao pesquisador Dr. Gustavo R. D. Funck (IRGA), pela colaboração no trabalho.

Por fim, a todos aqueles que me acompanharam e estiveram envolvidos de alguma maneira com esta minha etapa acadêmica.

DIVERSIDADE, POTENCIAL TOXIGÊNICO E PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Fusarium* ISOLADOS EM ARROZ¹

Autor: Larissa Bitencourt Gomes

Orientador: Prof. Dr. Emerson Medeiros Del Ponte

Coorientador: Profa. Dra. Eliana Badiale-Furlong

RESUMO

Neste estudo, 144 amostras de sementes de arroz oriundas de áreas de produção de sementes dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Goiás, cultivadas em três safras, foram analisadas quanto a presença de *Fusarium*. Colônias de espécies do complexo *Fusarium graminearum* (FGSC) foram identificadas em 43% das 110 amostras da safra 2011/12 com incidência média de 0,7% e colônias de outras espécies do gênero em 77% das amostras com incidência média de 3,6%. Quinze amostras com variada incidência de *Fusarium*, apresentaram concentração média da micotoxina deoxinivalenol (DON) de 5.750 µg/kg. Em uma coleção de 144 isolados purificados de *Fusarium* obtidos das sementes de arroz infectadas, foram identificadas, por métodos moleculares (genotipagem multilocus e similaridade com sequencias do gene TEF1-alfa), quatro complexos de espécies: *F. fujikuroi* (FFSC), *F. chlamydosporum* (FCSC), *F. graminearum* (FGSC) e *F. incarnatum-equiseti* (FIESC). Dentre os 96 isolados do FGSC, a espécie-genótipo tricoteceno predominante foi *F. asiaticum*-NIV (68/96), seguido de *F. graminearum*-15-ADON (14/96), *F. cortaderiae*-NIV (13/96) e um *F. meridionale*-NIV. Isolados de *F. asiaticum* oriundos do arroz e *F. graminearum* oriundos do trigo, quando cultivados em grãos de arroz, produziram a micotoxina predita pela genotipagem, NIV e 15-ADON, respectivamente. No entanto os isolados de *F. asiaticum* do trigo produziram DON e seus acetilados, discordando da genotipagem (NIV). Nos ensaios de patogenicidade em plantas de arroz, os isolados de *F. asiaticum* do arroz mostraram-se mais agressivos do que *F. asiaticum* e *F. graminearum* do trigo. Já no trigo, os isolados *F. asiaticum* do arroz foram os menos agressivos. Esses resultados suportam a hipótese que adaptação ao hospedeiro pode influenciar na distribuição das espécies do complexo. Na análise de tricotecenos nas sementes dos ensaios de patogenicidade no arroz, somente os isolados de *F. chlamydosporum* produziram DON (800 a 900 µg/kg). Nas inoculações em trigo, somente os isolados *F. asiaticum* oriundo do trigo produziram a micotoxina nivalenol. Os resultados deste estudo contribuem para o aumento do conhecimento sobre a diversidade de espécies de *Fusarium* em arroz e alertam sobre a alta contaminação com tricotecenos por um complexo de espécies toxigênicas.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (69p.) Fevereiro, 2014

DIVERSITY, TOXIGENIC POTENTIAL AND PATHOGENICITY OF *Fusarium* SPECIES IN RICE²

Author: Larissa Bitencourt Gomes

Adviser: Emerson Medeiros Del Ponte

Coadviser: Profa. Dra. Eliana Badiale-Furlong

ABSTRACT

In this study, 144 samples of rice seeds obtained from seed-growing areas of the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Goiás, during three seasons, were assessed for the presence of *Fusarium*. Fungal colonies resembling species of the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) were identified in 43% of 110 samples from the 2011/12 season with mean incidence of 0,7%. Also, colonies of other species of the genus were found in 77% of the samples with mean incidence of 3,6%. Fifteen seed samples that showed various *Fusarium* incidence levels had high levels of deoxynivalenol (DON) mycotoxin (mean = 5.750 µg/kg) and its acetylates. In a collection of 144 purified isolates obtained from the infected seeds, 19 species grouped in four species complexes were identified using molecular analysis (multilocus genotyping targeting FGSC and sequences of TEF1-alfa): *F. fujikuroi* species complex (FFSC), *F. chlamyosporum* species complex (FCSC), *F. graminearum* species complex (FGSC) and *F. incarnatum-equiseti* species complex (FIESC). Among the four phylogenetic species-trichothecene genotype within the FGSC, *F. asiaticum*-NIV was the most prevalent (68/96), followed by *F. graminearum*-15-ADON (14/96), *F. cortaderiae*-NIV (13/96) and one *F. meridionale*-NIV. *F. asiaticum* isolates from rice and *F. graminearum* from wheat produced the same trichothecene predicted by the PCR assay, NIV and 15-ADON, respectively. Nevertheless, *F. asiaticum* isolates from wheat did not produce NIV as predicted by the genotyping. In the pathogenicity assay in rice, *F. asiaticum* isolates from rice were more aggressive than *F. asiaticum* and *F. graminearum* isolates from wheat. In wheat, *F. asiaticum* from rice were the least aggressive isolates. The trichothecene analysis in seeds from the pathogenicity assays showed that only isolates of the FCSC produced DON (800 a 900 µg/kg). In wheat, only *F. asiaticum* from wheat produced NIV. Results of this study contributes to expand the knowledge on the diversity of *Fusarium* affecting rice seeds and raise concern about the high contamination of rice with trichothecenes possibly produced by a complex of toxigenic species. Also, it corroborates with the hypothesis that host preference possibly regulates distribution of species within the FGSC complex.

² Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (69p.) February, 2014.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Produção do Arroz	5
2.2 Espécies de <i>Fusarium</i> relatadas em arroz.....	6
2.3 <i>Fusarium graminearum</i> : diversidade, distribuição e potencial toxigênico	7
2.4 Complexo <i>Fusarium fujikuroi</i> : taxonomia e distribuição.....	10
2.5 Complexo de espécies <i>Fusarium chlamydosporum</i>	12
2.6 Métodos de identificação de <i>Fusarium</i> spp.	13
2.7 Métodos para detecção e quantificação de micotoxinas.....	15
2.8 Micotoxinas de <i>Fusarium</i> e ocorrência em arroz	16
2.9 Legislação para micotoxinas.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Organização geral do trabalho e experimentos.....	21
3.2 Área de estudo e metodologia de amostragem	22
3.3 Detecção e quantificação de <i>Fusarium</i> spp. em sementes.....	24
3.4 Isolamento, purificação e preservação de <i>Fusarium</i>	25
3.5 Crescimento micelial e extração de DNA	26
3.6 Identificação em nível de espécie/complexo de espécies	27
3.7 Caracterização do potencial toxigênico para tricotecenos.....	29
3.8 Ensaio de patogenicidade dos isolados	31
3.8.1 Inoculações em panículas de arroz.....	31
3.8.2 Inoculações em espigas de trigo.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Resultados.....	35
4.1.1 Incidência de <i>Fusarium</i> em sementes de arroz, safra 2011/12	35
4.1.2 Contaminação com tricotecenos em sementes de arroz.....	36
4.1.3 Identificação molecular para complexo/espécies.....	38
4.1.4 Produção de tricotecenos por isolados do FGSC.....	40
4.1.5 Ensaio de patogenicidade	41
4.2. Discussão	45
5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7 APÊNDICES	67

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas a partir de grãos de arroz e subprodutos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 7 de 18 fevereiro de 2011.....	20
2. Número de amostras de sementes de arroz por estado e região orizícola do estado para cada uma das três safras de cultivo, as quais foram analisadas quanto à presença de <i>Fusarium</i> spp.....	24
3. Descrição dos primers utilizados no estudo e com alvo para identificação de espécies de <i>Fusarium</i> e genótipos tricotecenos	28
4. Informações sobre os isolados de <i>Fusarium</i> obtidos de sementes de arroz e trigo e avaliados quanto à patogenicidade por inoculações em panículas de arroz irrigado, cv. IRGA 424.	32
5. Distribuição dos valores de incidência (média, variância e máximo) de <i>Fusarium</i> spp e <i>Fusarium graminearum</i> em sementes de arroz amostradas em diferentes regiões da safra de 2011/12.....	36
6. Incidência de espécies de <i>Fusarium</i> e concentração média de micotoxinas em 15 amostras de sementes de arroz oriundas da safra 2011/12 de cinco regiões produtoras do Estado do Rio Grande do Sul e com níveis variados de incidência.	37
7. Análise de correlação de Pearson (r) entre a incidência de <i>Fusarium</i> spp. (Fus) e complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> (CEFG) e a produção de micotoxinas em sementes de arroz da safra 2011/12. Áreas com fundo cinza apresentam os valores de r (valores em negrito com P<0.05) e a área com fundo branco os valores de probabilidade.	38
8. Número de isolados obtidos de sementes de arroz irrigado do Brasil e identificados para uma das espécies do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> e genótipos tricotecenos por metodologia de genotipagem multilocus e por sequenciamento do gene TEF 1- α	39
9. Número de isolados por complexo, espécies e linhagens de <i>Fusarium</i> identificadas a partir do seqüenciamento do gene TEF1- α , com sua respectiva similaridade média para os isolados com sequencias conhecidas. ...	39

	Página
10. Produção de tricotecenos por isolados de espécies do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> em cultivos em grãos de arroz quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência.	41
11. Incidência das espécies e concentração de tricotecenos após a inoculação de isolados pertencentes ao complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Fusarium chlamydosporum</i> quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência.	42
12. Severidade e concentração média de tricotecenos em tratamentos com inoculação de espigas de trigo com isolados de espécies do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> oriundos do arroz e do trigo.	45

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Fluxograma resumando as etapas da pesquisa que foi desenvolvida a partir do recebimento de amostras de sementes de arroz de lavouras de produção e áreas experimentais conduzidas nas safras de 2008/9, 2009/10 e 2011/12.	22
2. Localização dos municípios, com indicação da região orizícola, de onde foram obtidas 110 amostras de sementes de arroz produzidas em lavouras de produtores certificados durante a safra 2011/12.....	23
3. Etapas do experimento de patogenicidade. Inoculação por aspersão em plantas de arroz com suspensão de conídios (A) e incubação das plantas sob condições de alta umidade para promoção da infecção (B).....	33
4. Frequência de valores de incidência de <i>Fusarium</i> spp. (A) e <i>Fusarium graminearum</i> (B) em 110 amostras de sementes de arroz da safra 2011/12 de localidades dos estados do Rio Grande do Sul e Goiás. A linha tracejada vertical representa a média de incidência.	35
5. Sintomas induzidos por <i>Fusarium</i> inoculado em panículas de arroz. Plantas inoculadas com isolado <i>F. chlamydosporum</i> (A), semente contaminada com <i>F. asiaticum</i> , oriundos do arroz, observada durante a colheita (B), baixo percentual de germinação em sementes inoculadas com <i>F. asiaticum</i> , oriundos do arroz (C), sementes inoculadas com <i>F. asiaticum</i> , oriundo do trigo (D).	43
6. Severidade observada oito dias após a inoculação em plantas de trigo da cultivar Guamirim. (A) Isolado de <i>F. asiaticum</i> oriundo do trigo, (11Tr026) (B) Isolado de <i>F. asiaticum</i> oriundo do arroz, (09Ar024).....	44

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) se destaca entre os cultivos de cereais de maior importância mundial, sendo predominantemente cultivado para consumo interno nos países produtores (FAO, 2009), constituindo alimento básico para a nutrição humana (CONAB, 2014). O consumo médio mundial de arroz é estimado em 60 kg/pessoa/ano. Nos países asiáticos, onde se concentram 90 % da produção desse cereal, o consumo médio é estimado entre 100 e 150 kg/pessoa/ano. Já no Brasil o consumo está abaixo da média mundial, estimado em 45 kg/pessoa/ano (SOSBAI, 2011).

Segundo estatísticas oficiais, a produção mundial no ano de 2011 foi de aproximadamente 720 milhões de toneladas de arroz em casca (FAO, 2012). Os países maiores produtores de arroz estão localizados na Ásia: China, Índia, Indonésia, Bangladesh e Vietnã. Fora da Ásia, destacam-se o Brasil e os Estados Unidos da América, que ocupam, respectivamente, o 9º e 10º lugar no ranking da produção de arroz (FAO, 2012).

Dentre os fatores bióticos que limitam à produtividade e/ou depreciam a qualidade do arroz, destacam-se aqueles que afetam a sanidade das plantas tais como as plantas daninhas, doenças e pragas. Dentre as doenças, a brusone, causada por *Magnaporthe oryzae*, é considerada de maior impacto e potencial de danos em cultivares suscetíveis e clima favorável, podendo levar a perdas totais da lavoura (Ou, 1985). Além da brusone, mais de uma dezena de doenças fúngicas podem ocorrer com relativa importância e que podem atacar tanto o sistema radicular como a parte aérea das plantas de arroz (Ou, 1985; Lee & Rush, 1983; Franco *et al.*, 2001; Farias *et al.*, 2007).

Na cultura do arroz, a doença conhecida como bakanae é causada por *Fusarium*. Os sintomas dessa doença incluem podridão da coroa, nanismo ou alongamento anormal do colmo em decorrência da produção de giberelina pelo fungo (Desjardins *et al.*, 2000). Embora já relatada no Brasil há mais de quatro décadas (Mello *et al.*, 1970), não se tem registros de epidemias ou perdas pela bakanae no Brasil.

Mais comumente, além de alguns representantes dos complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* associadas com sintomas de bakanae ou em sementes (Wulf *et al.*, 2010), diversos outros complexos ou espécies de *Fusarium* têm sido relatados e associados exclusivamente às sementes de arroz (Desjardins *et al.*, 2000; Nyvall *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2009; Murthy *et al.*, 2009). A ocorrência de fungos que infectam as plantas antes da colheita ou que ocorrem por ocasião do armazenamento, em sementes do arroz, pode, além de permitir a sua sobrevivência e disseminação, afetar a germinação da semente e/ou emergência das plantas, impactando no estabelecimento da cultura (Ichinoe *et al.*, 1983). De outra forma, fungos toxigênicos que incidem nas sementes podem produzir micotoxinas de implicações toxicológicas quando do consumo dos grãos por humanos e animais. A patogenicidade ao homem é mais rara, no entanto, O'Donnell *et al* (2010) relataram a ocorrência de diversas espécies de *Fusarium* envolvidas com infecções em humanos e animais.

Além da cultura do arroz, *Fusarium* causa doenças em várias outras culturas, sendo um típico fungo fitopatogênico do ambiente do solo, do sistema vascular das plantas e de órgãos florais. O clima, e até mesmo variações locais de temperatura, podem afetar a distribuição das espécies de *Fusarium* e o seu potencial toxigênico (Desjardins *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 2001; Backhouse, 2014).

Diversas espécies de *Fusarium* comumente associadas aos grãos de arroz são reconhecidas produtoras de micotoxinas como fumonisinas, zearalenona e os tricotecenos, tais como a deoxinivalenol e a nivalenol (Desjardins, 2007; O'Donnell *et al.*, 2009; Lincy

et al., 2011). No Brasil, em consonância com normativas internacionais visando à segurança alimentar e com base na frequência com que micotoxinas têm sido encontradas em grãos e alimentos, foi estabelecida uma legislação para limites máximos tolerados para diversas micotoxinas em grãos de cereais, incluindo o arroz e seus subprodutos (ANVISA, 2011). Para o arroz, foram regulamentados limites máximos para as micotoxinas deoxinivalenol, fumonisina e zearalenona no ano de 2011, ambas produzidas por espécies de *Fusarium*, especialmente as do complexo de espécies *Fusarium graminearum* que têm sido as mais estudadas quanto à produção de tricotecenos.

A maioria dos estudos de levantamento e identificação de *Fusarium* em sementes ou grãos produzidos no território nacional relatam apenas o gênero, sendo raros registros em nível de espécie (Franco *et al.*, 2001; Macedo *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2003; Farias *et al.*, 2007). No entanto, é sabido que o potencial toxigênico das populações do fungo está estreitamente ligado à espécie (Leslie & Summerell, 2006). Com frequência, *F. graminearum*, típico produtor de tricotecenos e zearalenona tem sido relatado em sementes de arroz nas diferentes regiões do mundo em regiões onde ocorre cultivo de trigo e milho, hospedeiros principais (Leslie & Summerell, 2006; Lee *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2010).

No estado do Rio Grande do Sul, além dos relatos esporádicos de *F. graminearum* em sementes de arroz (Nunes *et al.*, 2003; Dors *et al.*, 2011), recentemente as micotoxinas desoxinivalenol e zearalenona foram detectadas em amostras de grãos de arroz de parcelas experimentais (Dors *et al.*, 2011; Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2012). No entanto, a falta de conhecimento mais aprofundado sobre a prevalência e o potencial toxigênico dos principais complexos de espécies de *Fusarium* limitam a caracterização de cenários de risco, especialmente de contaminação com micotoxinas, informação que é fundamental para embasar análises de risco e orientar quanto as micotoxinas que devem ser alvo de um monitoramento para detecção.

Este estudo objetivou: 1) detectar e quantificar a incidência de *Fusarium* e da concentração de tricotecenos em sementes de arroz irrigado; 2) identificar, em nível de espécie ou complexo de espécie, com base em métodos moleculares, uma coleção de isolados obtidos segundo característica morfológica; 3) caracterizar o potencial toxigênico de isolados por métodos cromatográficos e moleculares e 4) caracterizar e comparar a patogenicidade de algumas das espécies isoladas do arroz, com espécies isoladas de trigo, em inoculações em panículas de arroz e espigas de trigo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção do Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) constitui a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas (CONAB, 2011). A produção global gira oscila próximo a meio bilhão de toneladas de grãos em casca, contribuindo com quase um terço do total de grãos destinados à alimentação humana (FAO, 2009). Apesar do grande volume produzido, o arroz é um produto de pouca importância no comércio internacional, uma vez que é produzido primariamente para satisfazer as necessidades domésticas nos países ou regiões do mundo em que é produzido (FAO, 2009). Segundo estatísticas oficiais, até o início da década de 90 apenas 3% da produção mundial de arroz era exportada, índice que aumentou para 5% em 2007 (FAO, 2009).

O Brasil, com uma produção anual estimada entre 11 e 13 milhões de toneladas de arroz, está na lista dos 10 maiores produtores, participando com cerca de 82% da produção do Mercosul, seguido pelo Uruguai, Argentina e, por último, o Paraguai (FAO, 2012). Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina garantem o suprimento necessário à demanda doméstica (SOSBAI, 2011). A área cultivada no Rio Grande do Sul é de aproximadamente um milhão de hectares, sendo o estado maior produtor nacional deste cereal e responsável por 77% do total produzido no Brasil (CONAB, 2011). Demais estados produtores com uma menor contribuição incluem Mato Grosso (3,7% do total), Maranhão (5,6%) e Tocantins (3,8%) (FAO, 2012).

2.2 Espécies de *Fusarium* relatadas em arroz

Fusarium causa doenças em um grande número de plantas incluindo os cultivos cereais de maior importância para a alimentação humana e animal como o milho, trigo, arroz (Leslie & Summerell, 2006). No arroz, *Fusarium* causa uma doença conhecida como bakanae cujos sintomas incluem podridão da coroa, nanismo, bem como o estiolamento e alongamento anormal induzido pela produção de giberelina (Desjardins *et al.*, 2000). Embora a bakanae tenha sido descrita pela primeira vez há mais de 100 anos no Japão, ainda não foram sistematicamente identificadas as espécies de *Fusarium* associadas com as variadas formas de manifestação da doença (Amatulli *et al.*, 2010). Relatos anteriores feitos no Japão apontavam para *F. moniliforme* como a causa da doença (Ou, 1985). No entanto, este táxon não é mais usado e faz parte atualmente do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (denominado como complexo de espécies *Gibberella fujikuroi* anteriormente ao novo código de nomenclatura estabelecido em 2012 (ICBN, Artigo 59) (Desjardins *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2009). Fungos desse complexo são comumente encontrados associados às culturas de milho, cana-de-açúcar, abacaxi e arroz (Lee *et al.*, 2009; Crespo, 2010; Hsuan *et al.*, 2011).

No estado da Califórnia, Estados Unidos, o *Fusarium fujikuroi* foi citado como o agente causal do bakanae (Carter *et al.*, 2008). Em sementes de arroz oriundas da África e da Ásia, Wulff *et al.* (2010) identificaram quatro espécies desse complexo: *F. andiyazi*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*, associados ao bakanae. Na Itália, entre anos de 2006 e 2008, *Fusarium* foi isolado de plantas assintomáticas e com sintomas de bakanae, sugerindo ser o *Fusarium fujikuroi* o agente causal da doença (Amatulli *et al.*, 2010). Na Península da Malásia, *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* e *F. fujikuroi* foram isoladas de diferentes culturas, incluindo plantas de arroz com sintomas de bakanae (Hsuan *et al.*, 2011). Na Coreia do Sul, sementes de arroz de 48 campos com sintomas de uma fusariose nas panículas apresentaram uma alta incidência de

espécies do complexo de espécies *F. graminearum* (90%), dentre outras em menor frequência, não sendo essas identificadas ao nível de espécie filogenética do complexo de espécies *F. graminearum* (Lee *et al.*, 2009).

Savard e colaboradores relataram a ocorrência de espécies do complexo *Fusarium chlamydosporum* em arroz produzido na Península da Malásia (Savard *et al.*, 1990). Espécies desse complexo são comuns em ambiente de solo e em plantas de arroz quando encontram-se em situação de estresse, sendo também identificada como produtora de micotoxinas da classe dos tricotecenos (Lincy *et al.*, 2011).

No Brasil, no primeiro relato da bakanae no ano de 1967, a doença foi associada com *F. verticilioides* (Mello *et al.*, 1970). Atualmente, são inexpressivos os relatos dessa doença no Brasil. No entanto, diversos estudos têm relatado a ocorrência de *Fusarium* em sementes de arroz em todo o mundo. Nos Estados Unidos, nos estados de Arkansas e Texas, um estudo de levantamento, em vinte amostras de arroz em casca, relatou a presença de *F. proliferatum* associada com a presença de micotoxinas no arroz (Abbas *et al.*, 1998).

2.3 *Fusarium graminearum*: diversidade, distribuição e potencial toxigênico

Anteriormente reconhecido como uma morfoespécie, *Fusarium graminearum* foi dividido em um complexo de espécies com base no conceito de espécies filogenéticas com concordância genealógica (O'Donnell *et al.*, 2004). Atualmente, o complexo engloba 15 espécies (com epítetos) distribuídas nas diversas regiões do mundo e originadas de diferentes hospedeiros (Starkey *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2009; Sarver *et al.*, 2011). São elas: *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. boothi*, *F. mesoamericanum*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. asiaticum*, *F. graminearum*, *F. cortaderiae*, *Fusarium brasilicum* (O'Donnell *et al.*, 2004), *F. vorosii*, *F. gerlachii* (Starkey *et al.*, 2007), *F. aethiopicum*

(O'Donnell *et al.*, 2008), *F. ussurianum* (Yli-Mattila *et al.*, 2009), *F. nepalense* e *F. louisianense* (Sarver *et al.*, 2011).

Nas regiões produtoras de arroz e trigo dos países ocidentais e orientais, destacam-se *F. graminearum* e *F. asiaticum*, as mais comumente encontradas respectivamente (Suga *et al.*, 2008; Backhouse 2014). Na Ásia, *F. asiaticum* ocorre com predominância no Japão (Qu *et al.*, 2008) e na China (Gale *et al.*, 2002), onde foram também identificadas as espécies *F. meridionale* e *F. boothii* em menor prevalência (Yang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Um estudo de identificação, ecologia e patogenicidade comparativa conduzido na Coreia do Sul, sugere a hipótese de que *F. asiaticum* é uma espécie adaptada ao agroecossistema do arroz na Coreia do Sul e, assim, com vantagem competitiva sobre as demais espécies e culturas (Lee *et al.*, 2009).

Na Europa, foram identificadas as espécies *F. boothii* e *F. mesoamericanum*, além de *F. graminearum* sensu stricto (ou apenas *F. graminearum*) como a espécie predominante em diferentes hospedeiros (Láday *et al.*, 2004; Tóth *et al.*, 2005). Em um estudo de modelagem do efeito do clima na distribuição geográfica global de três espécies do complexo (*F. graminearum*, *F. asiaticum* e *F. boothii*) foi modelada a influência do clima na distribuição das espécies, sugerindo que *F. graminearum* é mais predominante no Norte da Ásia onde predomina temperaturas mais amenas e *F. asiaticum* no Sul da Ásia, onde as temperaturas são mais altas (Backhouse, 2014). No entanto Zhang *et al* (2012) acreditam não ser esse o fator crítico para distribuição dessas espécies. Uma hipótese alternativa é que o sistema de cultivo influencia a distribuição, com *F. asiaticum* predominando nas áreas onde o arroz é cultivado e *F. graminearum* em áreas onde ocorre a produção de milho (Lee *et al.*, 2012 , Zhang *et al.*, 2012).

Na América do Sul, Ramirez *et al* (2006) observaram a presença de *F. graminearum* em uma coleção de 133 isolados obtidos de grãos de trigo na Argentina. Também na Argentina, Sampietro *et al.* (2010) isolaram 66 isolados do milho e

identificaram 56 como *F. meridionale* e 10 isolados como *F. boothii*. No Uruguai, Umpiérrez-Failache *et al* (2013) obtiveram isolados de *F. asiaticum* oriundo de áreas de produção de trigo, as quais encontravam-se próximas a lavouras de arroz, sugerindo a hipótese de que essa espécie pode ter sido inicialmente introduzida na Ásia sobre o arroz, passando posteriormente para o trigo em regiões da Louisiana, onde a produção de arroz é comum (Gale *et al.*, 2011). Além disso, Lee *et al* (2009) relataram que *F. asiaticum* pode ser mais adaptado a um agroecossistema de arroz do que outras espécies do complexo.

No Brasil, uma grande diversidade das espécies filogenéticas tem sido demonstrada. Além de *F. graminearum*, foram identificadas outras cinco espécies filogenéticas em diversos hospedeiros (Del Ponte *et al.*, 2013). Em dois estudos com isolados obtidos de grãos de trigo produzido no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, foram identificadas as espécies *F. graminearum*, a predominante em mais de 90% dos isolados, e *F. meridionale* (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2011). Em grãos de cevada, de 92 isolados foram encontrados *F. graminearum* como a espécie dominante, seguido de *F. meridionale* e *F. austroamericanum* (Astolfi *et al.*, 2010).

A quimiotaxonomia para *F. graminearum* foi proposta inicialmente por Ichinoe *et al.* (1983), a partir da classificação de isolados oriundos do Japão, especificamente do grupo tricotecenos-B, como quimiotipos deoxinivalenol (DON) ou nivalenol (NIV). Posteriormente, foram descritos três outros quimiotipos de *F. graminearum* conforme a posição da acetilação destes compostos (Miller & Greenhalgh, 1999): 3ADON (3-acetildesoxinivalenol), um acetilado C-3 de DON; 15-ADON (15-acetildesoxinivalenol), um acetilado C-15 de DON, e NIV (nivalenol) um acetilado C-4 de DON (Desjardins *et al.*, 1993; Goswami & Kistler 2005).

Isolados de *F. graminearum* de trigo e cevada possuem, em sua grande maioria, o quimiotipo 15-ADON. Em contraste, em algumas regiões na China e Japão, *F. asiaticum* segrega para os quimiotipos 3-ADON ou NIV apenas, dependendo da região produtora

(Yang *et al.*, 2008). Na Coréia, isolados de *F. graminearum* recuperados de milho entre 1999-2001 no norte da província de Gangwon foram exclusivamente caracterizados como produtores de DON, enquanto que isolados de *F. asiaticum* isolados de arroz nas províncias do sul, produziram quase que exclusivamente a toxina NIV (97%) (Lee *et al.*, 2004). No Japão, de 183 isolados analisados, 80 foram identificados como *F. asiaticum* com quimiotipo NIV e 3-ADON apenas (Karugia *et al.*, 2009). Da mesma forma, isolados japoneses de *F. asiaticum* e *F. graminearum*, foram identificados como NIV e 3-ADON, respectivamente (Suga *et al.*, 2008). Nos EUA, na região de Louisiana, isolados coletados entre os anos de 2001 e 2007 em lavouras de trigo foram identificados com *F. graminearum*, sendo a maioria (79%) produtor de NIV.

Quanto à patogenicidade das espécies do complexo *F. graminearum* em arroz, são poucos os estudos. Goswami e Kistler (2005) estudaram a patogenicidade de 31 isolados de oito espécies filogenéticas originadas de diferentes regiões do mundo, e também hospedeiros. Em outro trabalho, isolados de *F. graminearum* e *F. asiaticum* foram inoculados em espigas de trigo e em panículas de arroz, com o objetivo de comparar a agressividade do patógeno. Apesar de terem reproduzido sintomas na forma de manchas em sementes de arroz, não foram detectadas micotoxinas nos grãos de arroz, pois a colonização do fungo não parece estar associada com a produção de micotoxinas (Desjardins *et al.*, 2000; Goswami & Kistler, 2005). Outra possível explicação discutida pelos autores é que o arroz possui um mecanismo de detoxificação capaz de metabolizar os tricotecenos (Goswami & Kistler, 2005).

2.4 Complexo *Fusarium fujikuroi*: taxonomia e distribuição

Grande parte das espécies de *Fusarium* é formadora de clamidósporos, porém o complexo *Fusarium fujikuroi* (Geiser *et al.*, 2013), possui justamente a característica de ausência desta estrutura. Para a identificação das espécies desse complexo as

características principais avaliadas são as células conidiogênicas que suportam o microconídio e a disposição dos esporos sobre as mesmas (Leslie & Summerell, 2006).

Espécies pertencentes ao complexo *Fusarium fujikuroi*, são de extrema importância para diversas culturas, incluindo o arroz e milho (Niehaus *et al.*, 2014). Na península da Malásia, várias espécies de *Fusarium* desse complexo, como *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* e *F. fujikuroi* foram isoladas e relacionadas com várias doenças de culturas agrícolas incluindo arroz, cana de açúcar e milho, sendo possível relacionar a presença de *F. verticillioides* com os sintomas de bakanae em arroz (Hsuan *et al.*, 2011).

Dentre as espécies que infectam mais o milho, destacam-se *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. *F. verticillioides* é semelhante ao *F. proliferatum*, o qual possui cadeias curtas de microconídios (menos de 20) em mono e polifiálides, diferenciando de *F. verticillioides* que possui cadeias longas de microconídios em monofiálide. *F. subglutinans* é relativamente fácil de ser separado das outras espécies importantes do complexo *F. fujikuroi*, pois possuem mono e polifiálides que produzem microconídios apenas em falsas cabeças (Leslie & Summerell, 2006).

Na cultura do milho, Stumpf e colaboradores identificaram a partir de uma coleção de 104 isolados três espécies pertencentes ao complexo *F. fujikuroi* (*F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*). As espécies agrupadas dentro desse complexo estão associadas a diversas doenças na cultura do milho, sendo a podridão da espiga uma das mais importantes (Stumpf *et al.*, 2013).

F. verticillioides é a principal espécie de fungo que produz micotoxinas fumonisinas do tipo B1 e B2 (Jurjevic *et al.*, 2005). Na Europa, *F. verticillioides* é mais prevalente nas regiões do sul e é encontrada associada com grãos de milho e subprodutos na França, Espanha e Itália (Bottalico, 1998). Isolados de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* foram isolados de diferentes regiões nas Filipinas, oriundos da cultura do arroz e milho e

caracterizados como potencialmente produtores de micotoxinas do tipo Fumonisin do tipo B1. *F. verticillioides* foi a espécie a mais frequentemente encontrada em grãos de milho e seus subprodutos, em países europeus como a França, Espanha e Itália (Fandohan *et al.*, 2003).

Com o intuito de conhecer melhor os sintomas da bakanae, Amatulli *et al* (2010) testaram a patogenicidade de 121 isolados de *Fusarium* spp. A partir de uma suspensão de esporos sementes de arroz foram inoculadas e posteriormente plantadas e os sintomas avaliados a partir de uma escala. Sintoma típico da doença apareceu nas plantas inoculadas com *F. fujikuroi* e as plantas inoculadas com *F. graminearum* apresentaram uma redução na germinação da semente.

2.5 Complexo de espécies *Fusarium chlamydosporum*

Os primeiros relatos de espécies do atual complexo de espécies *F. chlamydosporum* foi associado à cultura do milho, apresentando-se também como produtor de micotoxinas (Marasas *et al.*, 1984). A ocorrência de *F. chlamydosporum* em arroz foi relatada no ano de 1990 (Savard *et al.*, 1990). Com o passar dos anos essa espécie vem se tornando motivo de alerta para diversas culturas (O' Donnell *et al.*, 2009)

Em um estudo filogenético, isolados identificados como *F. nelsonii* foram agrupados ao complexo de espécies *Fusarium chlamydosporum* (FCSC), apresentando também uma estreita relação com o complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), ressaltando também a importância dessas espécies do âmbito clínico e veterinário (O' Donnell *et al.*, 2009). Na Austrália, isolados de *F. chlamydosporum* foram obtidos de campos de produção de gramíneas, no entanto relatam como sendo uma espécie com baixo potencial toxigênico (Summerell *et al.*, 2011).

Em um estudo na Índia, isolados pertencentes ao complexo FCSC foram obtidos de sementes de sorgo e foram descritos como produtores de tricotecenos, incluindo-se *F. nelsonii* descrita anteriormente como uma espécie do FCSC (Lincy *et al.*, 2011).

2.6 Métodos de identificação de *Fusarium* spp.

As espécies de *Fusarium*, por muito tempo, eram identificadas apenas por características morfológicas e especificidade com o hospedeiro. A taxonomia de *Fusarium* envolve três conceitos: morfológico, biológico e filogenético (Leslie *et al.*, 2006). A identificação morfológica ainda vem sendo utilizada, porém, existem situações em que apenas as características morfológicas não permitem uma identificação acurada e confiável (Leslie *et al.*, 2006). O número de estudos de caracterização de isolados, identificação e proposição de novas espécies no gênero *Fusarium* tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, principalmente após o advento da biologia molecular (Nirenberg & O'Donnell, 1998; Leslie *et al.*, 2001; Leslie *et al.*, 2006; Kvas *et al.*, 2009).

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia de polimerase, ou simplesmente PCR, permite identificar uma espécie com base na amplificação de um fragmento específico do genoma do patógeno, cujos produtos da amplificação podem ser diferenciados pelo tamanho do fragmento genômico ou sequência de nucleotídeos (Brioso *et al.*, 2001; Baird *et al.*, 2008).

Inicialmente descrito em 1988 o *multiplex* PCR consiste na amplificação simultânea de múltiplas regiões do DNA, a partir da adição de mais de um par de *primers* aos reagentes do *mix* (O. Henegariu *et al.*, 1997). Esta técnica é utilizada em muitos estudos moleculares, como na análise de deleções de genes (Chamberlain *et al.*, 1988) e na detecção de mutações e sequencias repetidas do DNA (Markoulatos *et al.*, 2002).

No caso de *F. graminearum* a partir do conhecimento de genes que regulam a síntese de tricotecenos e com o desenvolvimento da técnica PCR multiplex, alguns autores

têm desenvolvido *primers* para identificar genótipos de tricotecenos baseados em genes envolvidos na sua síntese como; *Tri3* e *Tri12* (Ward *et al.*, 2002), *Tri 7* e *Tri13* (Waalwijk *et al.*, 2003), *Tri3* e *Tri7* (Quarta *et al.*, 2006) ou *Tri3* e *Tri6* (Suzuki *et al.*, 2010).

Uma adaptação do uso PCR *multiplex* foi proposto por Ward *et al.* (2008), que se utilizaram da técnica de análise de multilocus (MLGT-*multilocus genotyping*) para genotipar tanto a espécie filogenética do complexo *Fusarium graminearum* quanto os genótipos tricoteceno, utilizando sondas específicas para o quimiotipo e para a identificação da espécie, ou seja, nessa reação são marcadas sondas, as quais são submetidas a extensão de *primers* alelo-específica utilizando a técnica *Luminex*, que faz a hibridização e detecção de sondas obtidas de uma reação de *multiplex*- PCR, fazendo assim uma análise de polimorfismo de nucleotídeos (Ward *et al.*, 2008), permitindo detecção de até 100 alvos diferentes em uma única amostra (Barco *et al.*, 2010). Suas principais vantagens são a facilidade do manuseio, permitindo flexibilidade na preparação de matriz e proporcionando uma rápida detecção de alto rendimento de alvos múltiplos, e a produção de dados numéricos, que podem ser facilmente coletados e usados para fins de comparação (Page *et al.*, 2006).

Uma evolução da PCR, o PCR em tempo real ou quantitativo (q-PCR), permite quantificar produtos de amplificação a cada ciclo de PCR. Essa tecnologia oferece várias vantagens sobre os métodos convencionais de PCR, tais como maior sensibilidade e especificidade, ausência da eletroforese em gel de agarose para detectar o produto da reação e, uma vez que a leitura e mensuração do acúmulo de produtos são obtidas a cada ciclo, traz, também, menor risco de contaminação, menor tempo de resposta e uma análise quantitativa (Schaad & Frederick, 2002; De Bôer *et al.*, 2007).

Associado às técnicas de PCR, pode-se identificar espécies com base no sequenciamento de fragmentos genômicos conservados. Para muitos pesquisadores, o sequenciamento direto de um ou mais genes podem ser usados para se identificar espécies

ou complexos de espécies. Neste processo, um ou mais genes são amplificados e sequenciados. Dentre os mais comumente seqüenciados para *Fusarium* destacam-se o fator alongação 1-alfa (EF-1 α), β Tubulina, histona, calmodulina, regiões IGS (*Intergenic Spacer Region*) e regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer Sequence*) (O'Donnell & Cigelnik, 1997; Steenkamp *et al.*, 2000; Mulè *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2006; Visentina *et al.*, 2009; O'Donnell, 2010).

Segundo Geiser *et al.* (2004), o sucesso no uso do gene EF-1 α pode ser atribuído ao seu alto grau de informação ao nível de espécie e ao fato de não ter sido relatado a ocorrência de cópias não ortólogas, bem como pela disponibilidade de *primers* universais baseadas nesse gene (Geiser *et al.*, 2004).

Uma das limitações para esta análise em algumas situações pode envolver um mais alto custo para um grande número de isolados. No entanto, é notável que esteja diminuindo nos últimos anos, e a disponibilidade de dados de sequência para as comparações necessárias em um banco de dados acessível, nesse caso o número de sequências disponíveis está aumentando de forma relativamente rápida (Ward *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2012).

2.7 Métodos para detecção e quantificação de micotoxinas

Os fungos filamentosos são capazes de produzir uma ampla gama de compostos químicos, dentre eles estão os metabólitos secundários, denominados micotoxinas (Stadler & Keller, 2008), ou seja, produtos naturais de baixo peso molecular que possuem uma atividade citotóxica (Desjardins *et al.*, 1993; Keller *et al.*, 2005).

A síntese de micotoxinas é usada como critério auxiliar na identificação de espécies, o que é conhecido por quimiotaxonomia (Ichinoe *et al.*, 1983; Logrieco *et al.*, 1988). Assim, a quimiotipagem é a determinação do tipo de micotoxinas produzidas pelo fungo *in vitro* ou *in vivo* por meio de métodos cromatográficos, destacando TLC (*thin-*

layer chromatography), HPLC (*high-performance liquid chromatography*) e GC (*gas chromatography*) (Krska & Molinelli, 2007; Frisvad *et al.*, 2007) como os mais comuns e tradicionais.

A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) é um método que permite limites de detecção em nível baixo, através de UV ou fluorescência, e uma quantificação mais exata (Lino *et al.*, 2006). É um método cromatográfico através do qual se separam os compostos numa amostra pela sua afinidade relativa para uma fase estacionária (coluna) e uma fase móvel, e o resultado da análise é um cromatograma com diversos picos, identificados pelo seu tempo de retenção, isto é, pelo tempo que o composto tarda a ser eluído (Serra, 2005).

Para detecção, quantificação e confirmação de fumonisina em milho e derivados, Lino *et al.* (2006) testaram diferentes metodologias analíticas, sendo uma delas o HPLC e métodos imunológicos, sendo a técnica de HPLC com detecção fluorimétrica a mais eficiente em comparação com as demais.

A cromatografia gasosa é a técnica mais utilizada na separação, identificação e quantificação de misturas de tricotecenos, embora também sejam utilizadas cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia de fluido supercrítico (Schollenberger *et al.*, 1998). Garda *et al.* (2004) utilizaram este método para determinação de tricotecenos, desoxinivalenol (DON) e toxina T-2, em cervejas comercializadas na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

2.8 Micotoxinas de *Fusarium* e ocorrência em arroz

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas dependem de uma complexa interação de diversos fatores, como atividade de água, temperatura, oxigênio e substrato (Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2012).

As micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. incluem representantes das classes dos tricotecenos e zearalenona, ambos produzidos por *F. graminearum*, além das fumonisinas que é produzida por *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum* (Reid *et al.*, 1999), sendo essas as mais conhecidas, no entanto espécies de *Fusarium* produzem outras micotoxinas como as beauverinas, enniatinas, fusaproliferinas, ácido fusarico, fusarinas e moniliforminas, acuminatum, butenolide, chlamydosporol, culmorinas, cyclodepsipeptide HA23, cyclonerodiol, equisetinas, fusarochromanone, gibberellinas, naphthoquinones, sambutoxinas e wortmanninas (Desjardins, 2006).

Os tricotecenos constituem um grupo de mais de 100 micotoxinas e possuem esse nome devido a sua estrutura química, composta de um anel com esqueleto tetracíclico 12,13-epoxitricotecenos. Essas toxinas são classificadas em tipo A, no qual se encontram as toxinas T-2, HT-2, 15-monoacetoxiscirpenol (15-MAS) e diacetoxiscirpenol (DAS), e em tipo B, no qual está o nivalenol (NIV), desoxinivalenol (DON) e suas formas acetiladas, 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON); (Santin *et al.*, 2000). A deoxinivalenol é produzida principalmente por *F. graminearum* e, em algumas regiões, por *F. culmorum*. Essa micotoxina comumente co-ocorre com zearalenona, também produzida por essas espécies (Richard, 2007)

O ácido fusárico é, provavelmente, uma das micotoxinas mais distribuídas na natureza uma vez que ela é produzida pela maioria das espécies do gênero *Fusarium*. O ácido fusárico possui a capacidade de aumentar a toxicidade de outras micotoxinas, e como não poderia ser diferente, essa micotoxina dificilmente aparece isolada em grãos contaminados por *Fusarium*, o que faz com que aumente sua importância nas micotoxicoses (Santin *et al.*, 2000).

Há grande variação em relação ao perfil toxigênico das espécies de *Fusarium* e se desconhece muito acerca do papel das micotoxinas na patogenicidade (Leslie & Summerell, 2006). No Brasil, relataram a ocorrência de Deoxinivalenol (DON) e

Zearalenona (ZEA) em arroz do tipo parboilizado, em amostras provenientes do estado do Rio Grande do Sul (Dors *et al.*, 2011). Aspecto semelhante foi relatado por Heidtmann-Bemvenuti *et al* (2012) ao avaliarem frações de arroz com casca (endosperma, casca e farelo) e parboilizado, onde detectaram, por cromatografia de alta performance, a presença de ZEA e DON.

Avaliações feitas em arroz do tipo integral, parboilizado e polido, no estado do Rio Grande do Sul, detectaram a presença de micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium*, (ZEA, DON e Toxina T2), no entanto não foi identificado nenhum fungo da espécie produtora (Nunes *et al.*, 2003). Estes fungos podem contaminar as amostras no campo e serem substituídas por outros gêneros mais adaptados às condições de armazenamento, porém a micotoxina pode permanecer (Pitt *et al.*, 1997; Samson & Reenen-Hoekstra, 1998). Uma das hipóteses, é que as condições climáticas no Brasil são, de maneira geral, favoráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos (Furlong *et al.*, 1995; Backhouse *et al.*, 2014).

Em outros países, foram avaliadas 20 amostras de arroz em casca provenientes de dois estados (Arkansas e Texas) dos Estados Unidos, para detecção da micotoxina fumonisina (B₁ e B₂) a qual foi associada com a ocorrência de *F. proliferatum*. Esse trabalho foi o pioneiro reatando a ocorrência de fumonisina em arroz (Abbas *et al.*, 1998).

Na Coreia, 48 amostras de sementes de arroz foram avaliadas, *Fusarium graminearum* foi encontrado em 91% das amostras, após análise de AFLP, observaram que a maioria pertencia a linhagem 6 (*F. asiaticum*) estando diretamente relacionada com a alta incidência de NIV, sendo possível inferir que essa linhagem está mais adaptada ao agroecossistema do arroz do que a outras linhagens (Lee *et al.*, 2009).

2.9 Legislação para micotoxinas

Evidências históricas associam surtos de toxicoses no Japão relacionadas ao consumo de grãos contaminados por *F. graminearum* em 1900 e também após 1945 - o caso conhecido como akakabi-byo (Desjardins *et al.*, 1993). Os sintomas clínicos desta toxicose incluem náusea, vômito, diarreia, tontura e alucinações (Desjardins *et al.*, 1993). Além disso, tricotecenos foram responsáveis diversos casos de em áreas rurais da Índia, China e Japão em 1961 (Ehling *et al.*, 1998).

Com o objetivo de assegurar a produção de alimentos saudáveis, vários países vêm adotando marco legal para regulamentar os limites máximos toleráveis de micotoxinas em grãos e subprodutos de cereais, inclusive o Brasil. A tomada de decisão sobre que micotoxinas regulamentar, em que produtos e em que níveis, é complexa. O estabelecimento de limites máximos tolerados por parte de um país é influenciado por diversos fatores, como os métodos analíticos disponíveis para o controle legal, os dados sobre toxicologia e ocorrência da micotoxina em alimentos usados no estabelecimento de risco, bem como a existência de legislação noutros países com que existam trocas comerciais (Serra, 2005).

A busca de soluções para minimizar o problema com as micotoxinas de *Fusarium* tem se baseado em estratégias que devem considerar múltiplas medidas adotadas de maneira integrada no processo produtivo, iniciando com a seleção de cultivares, a escolha da área e seu modo de preparo e da época de plantio, passando por tratamentos culturais e fitossanitários, até operações de colheita e tratamentos de pós-colheita, e finalizando em medidas legislativas que regulamentam níveis de tolerância de micotoxinas em grãos e seus derivados (Engelhardt *et al.*, 2006; Bryden, 2007).

Devido às dificuldades associadas ao manejo em pré-colheita em reduzir a concentração de micotoxinas nos grãos, muitos países promulgaram limites máximos toleráveis (LMT's) de concentração de micotoxinas em grãos e subprodutos (McMullen *et*

al., 2012; Gilbert & Haber, 2013). No Brasil entrou em vigor no ano de 2011 uma resolução que estabelece LMT para diversos tipos de grão e sub produtos (Anvisa, Resolução - RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011). O LMT para arroz e subprodutos varia, se mantendo estável para DON e aumentando no decorrer dos anos para ZEA, chegando a 100 µg/kg no ano de 2016 (Tabela 1). Até o momento não há legislação prevendo LMT para NIV, em alimentos ou rações, incluindo o arroz no Brasil (Leatherhead Food Research, 2010; Sugita-Konishi & Nakajima, 2010) gerando uma grande preocupação, uma vez que é sabida a presença dessa micotoxina em arroz (Heidtmann-Bemvenuti *et al*, 2012).

TABELA 1. Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas a partir de grãos de arroz e subprodutos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC N° 7 de 18 fevereiro de 2011.

Micotoxinas	Alimento	LMT	LMT	LMT	LMT
		(µg/kg) (2011)	(µg/kg) (2012)	(µg/kg) (2014)	(µg/kg) (2016)
Desoxivalenol (DON)	Arroz beneficiado e derivados	750	750	750	750
Zearalenona (ZEA)	Arroz beneficiado e derivados	-	200	200	100
	Arroz integral	-	800	800	400
	Farelo de arroz	1000	1000	1000	600

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organização geral do trabalho e experimentos

O estudo foi desenvolvido a partir do recebimento de amostras de sementes e panículas de arroz irrigado produzido no RS, SC e GO que foram analisadas quanto à presença de *Fusarium*. Para tal, foi utilizada a metodologia de incubação do material em substrato de papel, sendo avaliado o percentual de sementes infectadas com *Fusarium* nas amostras da safra 2011/12. No material incubado, *Fusarium* foi isolado a partir das colônias desenvolvidas com características típicas do gênero. Uma coleção de isolados selecionados com base na morfologia foi purificada e conservada para posterior produção de micélio e extração do DNA para proceder a identificação com base em métodos moleculares. Da coleção identificada, alguns isolados foram selecionados para se avaliar o potencial toxigênico para produção de tricotecenos por meio da produção das micotoxinas em substrato artificial. Finalmente, isolados representantes das espécies dominantes foram caracterizados quanto a patogenicidade em experimentos de inoculação cruzada em panículas de arroz e espigas de trigo, onde se comparou a agressividade e produção dos tricotecenos nos grãos formados. A Figura 1 apresenta o fluxo das atividades desenvolvidas nos experimentos.

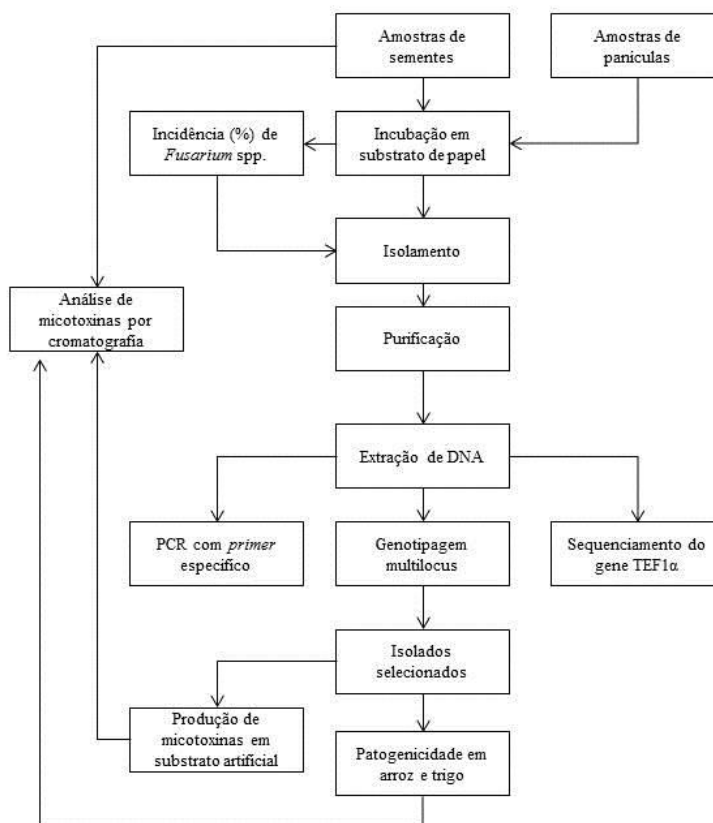


FIGURA 1. Fluxograma resumindo as etapas da pesquisa que foi desenvolvida a partir do recebimento de amostras de sementes de arroz de lavouras de produção e áreas experimentais conduzidas nas safras de 2008/9, 2009/10 e 2011/12.

3.2 Área de estudo e metodologia de amostragem

Amostras de sementes de arroz (10-200g) foram obtidas de três safras de cultivo (2008/09, 2009/10 e 2011/12) e de três estados do Brasil em número variado por safra e região, totalizando 144 amostras (Tabela 2). As amostras dos estados do RS, de SC e de GO foram enviadas por colaboradores do Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) e Embrapa Arroz e Feijão, respectivamente.

Das amostras recebidas da safra 2011/12 no RS, foram selecionadas somente as das cultivares Puitá INTA CL e IRGA 424, as duas mais plantadas no estado, totalizando 60 amostras da cultivar Puitá INTA CL e 38 amostras da cultivar IRGA 424. Essas amostras

foram provenientes de diferentes municípios localizados nas seis regiões produtoras do RS (Figura 2), em número variado por região (Tabela 2). De GO, as amostras de sementes foram oriundas dos experimentos de campo conduzidos nos municípios de Brazabrantes e Santo Antônio de Goiás. Todas as amostras de sementes foram identificadas e acondicionadas dentro de sacos de papel e mantidas sob condições de congelamento (-20 °C).

Além das amostras de sementes, foram selecionadas 20 panículas com sintomas de brusone do arroz coletadas em lavouras comerciais de arroz irrigado dos municípios de Nova Veneza, Criciúma e Itajaí do estado de Santa Catarina, as quais apresentaram crescimento de colônias típicas de *Fusarium* durante a incubação do material.

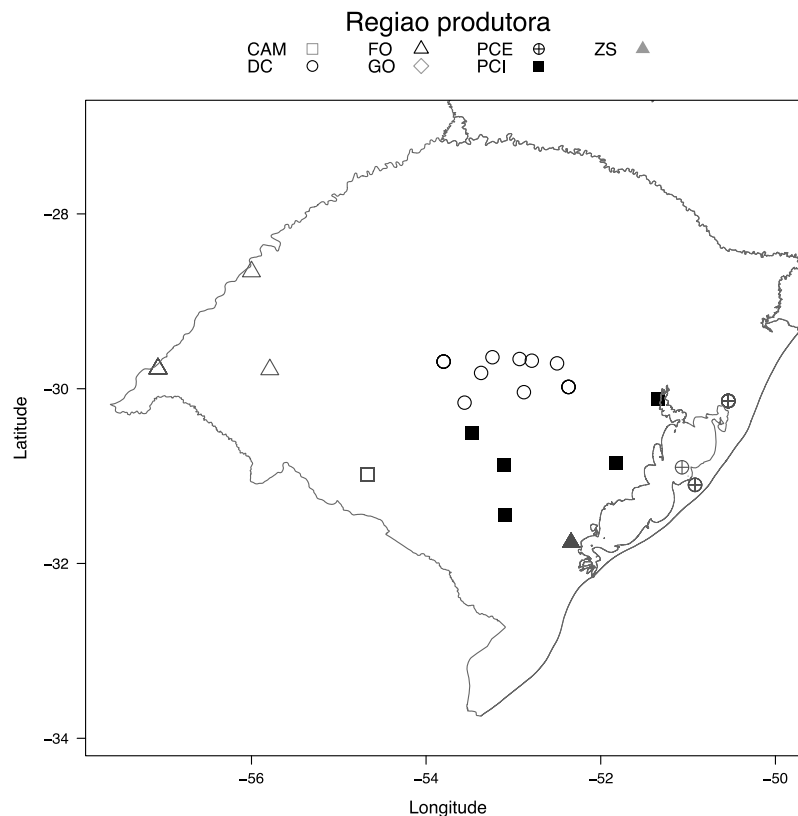


FIGURA 2. Localização dos municípios, com indicação da região orizícola, de onde foram obtidas 110 amostras de sementes de arroz produzidas em lavouras de produtores certificados durante a safra 2011/12. Regiões produtoras: CAM= Campanha, DC= Depressão Central, FO= Fronteira Oeste, PCE= Planície Costeira Externa, PCI= Planície Costeira Interna e ZS= Zona Sul.

TABELA 2. Número de amostras de sementes de arroz por estado e região orizícola do estado para cada uma das três safras de cultivo, as quais foram analisadas quanto à presença de *Fusarium* spp.

Estado / Região orizícola ¹	Saфра			Total
	2008/09	2009/10	2011/12	
Rio Grande do Sul				
Campanha	- ²	-	22	22
Depressão Central	-	-	15	15
Fronteira Oeste	-	-	12	12
Planície Costeira Externa	24	6	26	56
Planície Costeira Interna	-	-	10	10
Zona Sul	2	-	13	15
Santa Catarina	2	-	-	2
Goiás	-	-	12	12
Total	28	6	110	144

¹ Regiões orizícolas no estado do Rio Grande do Sul definidas pelo IRGA (Instituto Riograndense do Arroz);

² Amostra não recebida.

3.3 Detecção e quantificação de *Fusarium* spp. em sementes

Todas as amostras de sementes foram submetidas ao método de detecção por Blotter Test (Brasil, 2009). No teste, 200 sementes foram desinfetadas superficialmente (álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%) e dispostas em recipientes (10 x 10 cm) plásticos (25 grãos por recipiente) sobre três folhas de papel do tipo “mata borrão”, umedecido com água destilada autoclavada. Os recipientes foram mantidos em uma câmara incubadora ção à temperatura de 23±2 °C e fotoperíodo de 12 horas por um período de sete dias (Brasil, 2009). As sementes foram analisadas visualmente com o auxílio de um microscópio estereoscópio em aumento de 70x e identificadas as colônias com morfologia típica de *Fusarium*.

Para o conjunto de 110 amostras de sementes da safra 2011/12, provenientes do RS e de GO, durante a leitura, foi anotado o número de sementes infectadas, com base na morfologia da colônia fúngica sobre a semente, separando-as em dois grupos: colônias típicas de *Fusarium graminearum* e de um outro grupo englobando as demais espécies do

gênero. Para essas amostras, os resultados foram expressos em prevalência, ou o percentual de lotes infectados e a incidência em cada lote, ou seja, o percentual de sementes infectadas na amostra. Essa avaliação não foi feita para as 34 amostras das safras 2008/09 e 2009/10, onde apenas procedeu-se ao isolamento de colônias típicas de *Fusarium*.

3.4 Isolamento, purificação e preservação de *Fusarium*

Durante a avaliação das amostras para a detecção de *Fusarium* nas sementes, foi feito o isolamento do fungo a partir de todas as sementes que apresentaram colônias com características típicas do complexo de espécies *F. graminearum*. Para as sementes com colônias com características das demais espécies de *Fusarium*, isolou-se até um número máximo de cinco sementes colonizada por amostra. O isolamento foi feito para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com sulfato de estreptomicina (50 mg/L) e incubados por sete dias em câmara de crescimento a temperatura de 25 °C.

A obtenção de isolados a partir de panículas foi realizada em condições de câmara úmida. As panículas foram previamente desinfetadas em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, e dispostas individualmente em placas de Petri recobertas com papel de filtro embebido em água esterilizada e incubadas a uma temperatura de aproximadamente 25 °C durante 24 horas. Após esse procedimento, até dois fragmentos de micélio por panícula foram transferidos para placas que continham meio de cultura BDA para e posteriormente proceder a purificação. As placas foram incubadas a 25 °C, durante sete dias.

A purificação foi feita por cultivo monospórico segundo Leslie & Summerell (2006). Os macroconídios e microconídios, quando presentes, de culturas de sete dias em meio SNA (*synthetic nutrient-poor agar*), foram transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada estéril e submetidos a uma leve agitação para dispersão dos esporos. Em seguida, 1 ml da solução de esporos foi espalhada com auxílio de uma alça de

Drigalski em placas de Petri contendo ágar-água 2%. As placas foram incubadas no escuro, inclinadas em 45°, a uma temperatura de 25 °C por um período de 18 a 24 horas.

Após a incubação, foi removido, com o auxílio de um estereomicroscópio e agulha histológica, um fragmento do meio de cultura ágar-água contendo apenas um esporo germinado. Cada um desses fragmentos foi transferido para uma placa contendo meio de cultura SNA, sendo, posteriormente, incubado em uma câmara de crescimento com temperatura de 20 °C ± 2 °C, sob luz branca fluorescente e fotoperíodo de 12 horas em escuro por sete dias. Após a incubação, fragmentos de SNA contendo o isolado foram colocados em microtubos (1,5 ml), devidamente codificados e armazenados a -20 °C.

3.5 Crescimento micelial e extração de DNA

A extração do DNA genômico foi feita segundo o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987), com modificações. Plugs de micélio dos isolados purificados foram reativados em cultivo em meio BDA por 7 dias. A massa de micélio foi retirada, secada em papel filtro e armazenada a -4 °C. Posteriormente, o micélio macerado em nitrogênio líquido foi transferido para microtubos de 1,5ml, onde foi adicionado 750 µL de tampão CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA (pH 8,0)) e 15µL de β-mercaptoetanol, incubados a 65 °C por 15 minutos, seguido de extração com solvente orgânico adicionando 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após a centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos, foram transferidos 500 µL do sobrenadante para novos microtubos e adicionados 5 µL de suspensão contendo 20 mg/mL de RNA'se, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A precipitação do DNA foi feita com 500 µL de isopropanol e, posteriormente, 250 µL de acetato de amônio 7,5 M. Após a centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 100 µL de etanol 70% . O pellet foi resuspendido em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,1 mM EDTA). As amostras de DNA foram mantidas a -4 °C.

3.6 Identificação em nível de espécie/complexo de espécies

As espécies de *Fusarium* foram identificadas por métodos moleculares utilizando-se diferentes *primers* (Tabela 3). Os isolados identificados como do FGSC, por morfologia, foram identificados por PCR com *primers* específicos para FGSC, que produz bandas com polimorfismos mas não permite acuradamente identificar a espécie filogenética (Nicholson *et al.*, 1998). Foram também testados *primers* específicos para as espécies do complexo como os desenvolvidos por Suzuki *et al* (2010) para identificar *F. asiaticum*. No entanto, nos testes preliminares os fragmentos não foram amplificados, mostrando falta de especificidade do primer.

Assim, para identificar os isolados para uma das 15 espécies do FGSC, foi utilizado um ensaio multiplex de genotipagem multiloco por citometria de fluxo (Luminex® 100) (Ward *et al.*, 2008) utilizando-se um conjunto de sondas para as espécies já reconhecidas (Ward *et al*, 2008; Yli-Mattila *et al*, 2009). Essas análises foram conduzidas por meio de uma colaboração com o Dr. Todd Ward, do USDA (*United States Department of Agriculture*) em Peoria, IL, Estados Unidos, que recebeu o DNA das amostras. No laboratório do USDA, os isolados que não puderam ser identificados pelo método de genotipagem multilocus, seja por falha na reação ou por incerteza na leitura, foram submetidos ao sequenciamento da porção do gene fator de alongação-1alfa (TEF1-alfa), com os *primers* Ef1 e Ef2 descritos por Geiser *et al.* (2004) (Tabela 3). No caso da falha na identificação pela genotipagem multilocus, considerou-se dois motivos: 1) baixa qualidade do DNA extraído ou 2) se tratar de uma nova espécie do complexo *F. graminearum* não presente no conjunto de sondas ou uma espécie de outro complexo.

Para os isolados identificados durante os isolamentos como pertencentes a outras espécies, que não ao FGSC, foram conduzidos os seguintes procedimentos para o sequenciamento de porções do gene TEF1- α , seguindo a metodologia do laboratório do

USDA. Para amplificação, as condições de PCR foram de 1 ciclo inicial de 8 minutos a 95 °C (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 30 segundos de 95 °C (desnaturação), 53 segundos a 60°C (anelamento), 60 segundos a 72 °C (extensão) e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C (extensão final). O volume total das reações de amplificação foi de 25 µL contendo DNA genômico, 10X PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) , 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1mM de cada 'primers'. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Tpersonal Whatman Biometra. Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit ExoSap-IT (GE Health Care) segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Os fragmentos amplificados foram encaminhados para seqüenciamento Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Para a identificação da espécie, as sequências de DNA obtidas foram alinhadas e comparadas com sequências disponíveis no banco de dados Fusarium-MLST (www.cbs.knaw.nl/fusarium/), observando-se os índices de similaridade para a identificação da espécie.

TABELA 3. Primers utilizados no estudo e com alvo para identificação de espécies de *Fusarium* e genótipos tricotecenos.

Primer	Sequência 5'-3'	Gene/ Espécie alvo	Pb	Referência
Fg 16/F	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	FGSC ¹	400-500	Nicholson <i>et al.</i> (1998)
Fg 16/R	GGTAGGTATCCGACATGGCAA			
3CON	TGGCAAAGACTGGTTCAC	Tri3	243	Ward <i>et al.</i> (2002)
3NA	GTGCACAGAATATACGAC		610	
3D15A	ACTGACCCAAGCTGCCAC		840	
3D3A	CGCATTGGCTAACACATG			
12CON	CATGAGCATGGTGATGTC	Tri12	410	Ward <i>et al.</i> (2002)
12NF	TCTCCTCGTTGTATCTGG		670	
12-15F	TACAGCGGTCGCAACTTC		840	
12-3F	CTTTGGCAAGCCCGTGCA			
6A3AF	CCAAGACTTKGTTMCCCGAAGCAATC	Tri6	110	Suzuki <i>et al</i> (2010)
6A3AR	TTTAGAGTGCCGACCAAGC		660	
6CNF	AAATGCCCGTATCCCGCAACAATAT			
6ANR	CAATGGCTGTGCA			
EF1	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC	TEF1- α	700	Geiser <i>et al.</i> (2004)
EF2	GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT			

¹ Complexo de espécies *Fusarium graminearum* (O'Donnel *et al.*, 2004).

3.7 Caracterização do potencial toxigênico para tricotecenos

O potencial toxigênico para a produção dos tricotecenos DON, e suas formas acetiladas 3-Acetil(A) deoxivalenol (DON) e 15-ADON, e o NIV foi determinado por meio de método molecular (genotipagem) para todos os isolados do complexo de espécies *F. graminearum*.

Essa identificação foi feita concomitante à identificação da espécie pelo método de genotipagem multiloco (MLGT), no laboratório do USDA, que contém as sondas específicas para os genes *Tri3* e *Tri12* relacionados à síntese dos tricotecenos nas espécies produtoras do clado tricoteceno-B (Ward *et al.*, 2008). Para os isolados cujo DNA foi sequenciado no Brasil e identificados como pertencentes ao complexo de espécies *F. graminearum*, por sequenciamento do gene TEF1-alfa, o genótipo tricoteceno foi determinado por PCR multiplex a partir dos primers *Tri3* e *Tri12* (Ward *et al.*, 2002) (Tabela 3).

Os isolados representantes das espécies filogenéticas do complexo *F. graminearum* foram também caracterizados, ou quimiotipados, pela análise da produção dos tricotecenos em cultivos em substrato artificial (grãos de arroz). A análise da produção de tricotecenos em grãos de arroz seguiu o protocolo descrito por Puri & Zhang (2010). Grãos de arroz parboilizado (20g), dispostos em placas de Petri de vidro (60 x 90 mm), foram embebidos em 10 ml de água destilada durante 10 horas e, posteriormente, esterilizados. Após, os grãos de arroz foram inoculados com três discos (0,5 cm) de crescimento micelial em meio BDA por sete dias. Foram preparadas duas placas para cada isolado. Para promover um crescimento mais homogêneo, as placas foram agitadas no segundo, quarto e sexto dia de crescimento. As culturas foram incubadas em escuro por 21 dias a 25 °C. Após, as amostras foram retiradas das placas e secas em estufa a 60° C durante 24 horas.

As micotoxinas foram extraídas seguindo o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), proposto por Zachariasova *et al.* (2010), com

modificações (HEIDTMANN-BEMVENUTI *et al.*, 2012). Os padrões analíticos dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), 3 acetil desoxinivalenol (3-ADON)15-acetil desoxinivalenol (15-ADON) e nivalenol (NIV), foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). As fases móveis utilizadas para determinação cromatográfica (acetonitrila grau cromatográfico J. T. Baker Mallinckrodt, Phillisburg, NJ, USA e água ultrapurificada em sistema Direct-Q UV3[®] de resistividade 18,2 MΩ cm, Millipore, Bedford, USA) as quais foram previamente desgaseificadas em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique, 1600 W) e a acetonitrila filtrada em filtro Millipore (Supelco, 58067), com poros de 0,45 μm de diâmetro.

As condições cromatográficas foram por fase reversa Coluna: C18, Supelco, 25 cm x 4,6 mm, 10 μm (fenóis). Fluxo: 1 ml/min, tempo de corrida; 27 min. A biomassa fúngica produzida em substrato de arroz parbolizado foi moída em moinho de facas até a granulometria média de 40 mesh. Foram tomadas 10g de amostras em erlenmeyer de 250 ml aonde foram adicionados 20 mL de água destilada e 20 mL de acetonitrila acidificada com 0,2 mL de ácido acético glacial. A mistura foi agitada em um agitador horizontal (5 min/250 rpm) e logo após, foram adicionados a essa mistura 1,5 g de sulfato de magnésio e 0,85 g de acetato de sódio e, na sequência a mistura foi novamente agitada por mais 5 minutos.

O extrato foi centrifugado (10 min/14000 rpm), removendo-se 6 ml do sobrenadante, e adicionado mais 0,3 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de celite, e novamente agitado por 1 min. Ao final do processo foram coletados 3 mL do sobrenadante, que foi seco em banho maria. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspendido em 1 mL da fase móvel e centrifugado a 1200 g (Eppendorf Centrifuge 5410, Hamburg, Germany).

Os tricotecenos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com os obtidos no cromatogramas das amostras. Para confirmação de identidade

do contaminante foi usada a co-cromatografia. A concentração dos contaminantes nas amostras foi estimada empregando curva analítica de padrões externos dos tricotecenos. Todas as determinações foram realizadas em colaboração com a Profa. Eliana Badiale Furlong, do Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande.

3.8 Ensaios de patogenicidade dos isolados

Para avaliar e comparar a patogenicidade das espécies foram selecionados isolados da espécie filogenética do FGSC que ocorreu em maior frequência na coleção de isolados. Para fins de comparação, foram incluídos dois isolados mesma espécie, porém oriundos de grãos de trigo do Estado do Rio Grande do Sul e com comprovada patogenicidade. As inoculações foram feitas com os mesmos isolados nas culturas do arroz e na cultura do trigo (inoculação cruzada) com o objetivo de avaliar uma possível especialização ou adaptação de isolados em seu hospedeiro de origem, no caso o arroz e o trigo. O efeito dos tratamentos, em cada experimentos, foi avaliado pela Anova e teste de separação das médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.8.1 Inoculações em panículas de arroz

Sementes de arroz da cultivar IRGA 424 foram plantadas em bandejas de isopor e mantidas em casa-de-vegetação com temperatura média de 25°C e a umidade relativa ao redor de 60%. Quando atingiram o estágio de V4 (colar formado na quarta folha do colmo principal) as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade para 8L.

Os tratamentos foram constituídos de sete isolados inoculados individualmente, além de uma testemunha inoculada com água, totalizando oito tratamentos. Foram inoculados dois isolados da espécie dominante em arroz e dois isolados dessa mesma espécie oriunda do trigo. Para fins de comparação, um tratamento controle constou de um isolado da espécie filogenética *F. graminearum*, também oriunda do trigo e previamente caracterizada como patogênica (Spolti *et al.*, 2013). Por fim, dois isolados do complexo de

espécies mais frequente nas amostras, que não o complexo *F. graminearum*, foram também inoculados (Tabela 4).

A inoculação foi feita por aspersão com uma suspensão de macroconídios (1×10^5 conídios/ml) direcionadas às panículas nos estágios entre as fases de antese e enchimento do grão. Após a inoculação, as plantas foram individualmente cobertas com saco plástico e incubadas à 25°C por 48 h (Figura 2). Após, os sacos plásticos foram retirados e as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até a maturação fisiológica.

TABELA 4. Informações sobre os isolados de *Fusarium* obtidos de sementes de arroz e trigo e avaliados quanto à patogenicidade por inoculações em panículas de arroz irrigado, cv. IRGA 424.

Código do isolado	Espécie / complexo ¹	Genótipo tricoteceno ²	Hospedeiro de origem
09Ar021	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Arroz
09Ar024	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Arroz
B8	<i>F. graminearum</i>	15-ADON	Trigo
11Tr025	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Trigo
11Tr026	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Trigo
09Ar003	<i>F. chlamyosporum</i>	ND ²	Arroz
09Ar008	<i>F. chlamyosporum</i>	ND	Arroz

¹Espécies filogenéticas do complexo de espécies *Fusarium graminearum*, segundo O'Donnell *et al* (2004); ²Determinado por método molecular com os primers *Tri3* e *Tri 12* e genotipagem multiloco; ³Não determinado.

Após a inoculação, as panículas não foram avaliadas quanto à presença de sintomas de *Fusarium* antes da colheita, devido ao desconhecimento dos sintomas típicos e confundimento com outros agentes causadores de manchas, como manchas por pulgões. No entanto, foram obtidas fotografias dos sintomas produzidos pelos diferentes isolados.

Após a colheita e trilha manual, os tratamentos foram comparados quanto ao grau de patogenicidade (agressividade) por meio da incubação de 100 sementes escolhidas aleatoriamente nas panículas inoculadas, em substrato de papel para avaliação do percentual de sementes pelo patógeno inoculado. Uma outra parcela dos grãos foi moída

até se obter uma massa mínima de 10g e submetidos à análise dos tricotecenos conforme item 3.5.

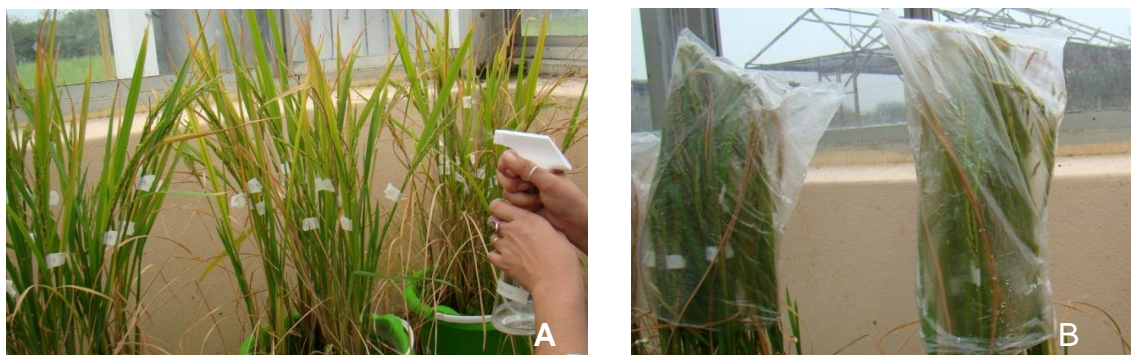


FIGURA 3. Etapas do experimento de patogenicidade de isolados de *Fusarium* em plantas de arroz. Inoculação por aspersão em plantas de arroz com suspensão de conídios (A) e incubação das plantas sob condições de alta umidade para promoção da infecção (B).

3.8.2 Inoculações em espigas de trigo

Sementes de trigo da cultivar BRS Guamirim foram semeadas em vasos (5 l) contendo substrato (1:1:1 húmus, solo e vermiculita) fertilizada com macronutrientes (10-10-10 NPK). As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura média foi de 25°C e a umidade relativa do ar próximo a 60%.

Assim como na inoculação das plantas de arroz, o tratamentos, incluindo uma testemunha inoculada com água, constaram de cinco isolados: dois isolados da espécie predominante oriundos do arroz, dois isolados dessa mesma espécie oriundos do trigo, além do isolado *F. graminearum* oriundo do trigo comprovadamente agressivo em trigo (Spolti *et al.*, 2013).

As plantas foram inoculadas por aspersão com uma suspensão de macroconídios (1×10^5 conídios/ml) no estágio antese plena. Após a inoculação, as plantas foram individualmente cobertas com saco plástico e incubadas a 25°C por 48 h. Após, os sacos plásticos foram retirados e as plantas mantidas em casa-de-vegetação.

A agressividade dos isolados foi comparada pela avaliação da severidade de giberela (proporção de espiguetas gibereladas numa espiga) em todas as espigas inoculadas. As avaliações tiveram início quatro dias após a inoculação e seguiram de dois em dois dias até o momento da maturação dos grãos (40 dias após a inoculação). Após, os grãos foram manualmente colhidos, limpos e moídos até atingirem 10g para a determinação do tricotecenos conforme descrito anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados

4.1.1 Incidência de *Fusarium* em sementes de arroz, safra 2011/12

Do total de 110 amostras obtidas na safra 2011/12 das localidades do RS e GO, que foram analisadas pelo teste de incubação em papel de filtro, *Fusarium* foi encontrado em 96 delas, sendo *F. graminearum* detectado em 43% das amostras e outras espécies de *Fusarium* em 77% das amostras. Uma maior frequência a partir de valores mais altos de incidência, até 12,5%, foi encontrada em *Fusarium* spp., com média de 3,5% (Figura 4A) do que *F. graminearum*, que teve o máximo de 3,5% de incidência em uma amostra, com média de 0,80% nas amostras (Figura 4B).

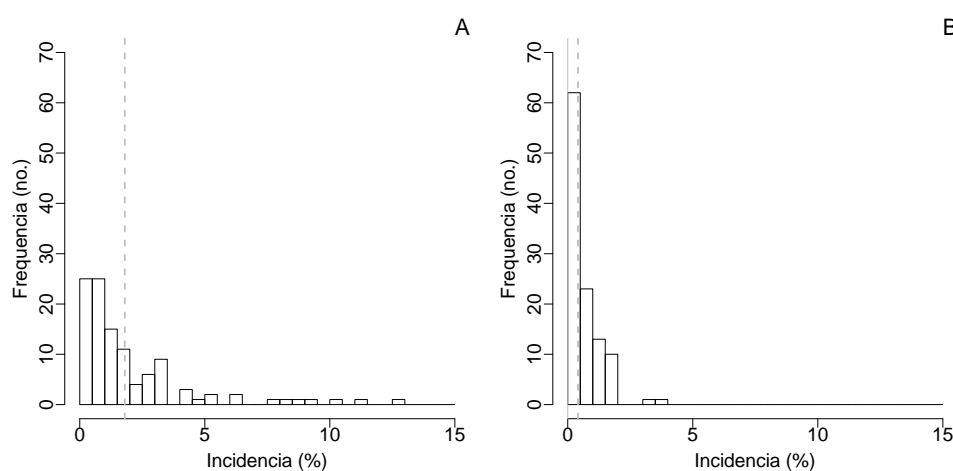


FIGURA 4. Frequência de valores de incidência de *Fusarium* spp. (A) e *Fusarium graminearum* (B) em 110 amostras de sementes de arroz da safra 2011/12 de localidades dos estados do Rio Grande do Sul e Goiás. A linha tracejada vertical representa a média de incidência.

A incidência de *Fusarium* nas amostras variou conforme a região orizícola. Os maiores valores de incidência de *Fusarium* spp. foram encontrados na região da Fronteira Oeste, seguida pela Planície Costeira Interna e os menores valores na região da Campanha e no estado de Goiás. Para *Fusarium graminearum*, não houve variação marcante entre as regiões, uma vez que os valores foram muito baixos (Tabela 5).

TABELA 5. Distribuição dos valores de incidência (média, variância e máximo) de *Fusarium* spp e *Fusarium graminearum* em sementes de arroz amostradas em diferentes regiões da safra de 2011/12.

Estado	Região ¹	N	<i>Fusarium</i> spp. (%)			<i>Fusarium graminearum</i> (%)		
			Média	Var	Máx	Média	Var	Máx
RS	Campanha	22	1,36	2,62	6	0,59	1,96	6
	Depressão Central	15	3,26	6,20	9	0,13	0,12	1
	Fronteira Oeste	12	9,08	37,53	20	0,83	1,42	3
	Planície Costeira Externa	26	2,08	4,44	6	0,16	0,15	1
	Planície Costeira Interna	10	6,11	45,54	25	1,46	2,33	7
	Zona Sul	13	2,11	8,54	10	1,5	1,61	3
GO		12	0,38	0,42	2	0,92	0,91	3
Total		110	3,48	24,27	25	0,80	1,58	7

¹Regiões orizícolas no estado do Rio Grande do Sul definidas pelo IRGA (Instituto Riograndense do Arroz).

4.1.2 Contaminação com tricotecenos em sementes de arroz

Das 15 amostras de sementes de arroz selecionadas com base nos níveis de incidência de *Fusarium*, a concentração média de DON foi de 5.750 µg/kg. Todas as amostras apresentaram níveis detectáveis de DON, incluindo suas formas acetiladas, com concentração média de 85.500 µg/kg. No entanto, em uma amostra não foi detectada a presença de DON, somente das formas acetiladas 3-ADON e 15-ADON. Nas amostras em

que os valores de incidência de *Fusarium* spp e *F. graminearum* foi igual a zero, houve a produção de DON e 15-ADON (Tabela 6).

TABELA 6. Incidência de espécies de *Fusarium* e concentração média de micotoxinas em 15 amostras de sementes de arroz oriundas da safra 2011/12 de cinco regiões produtoras do Estado do Rio Grande do Sul e com níveis variados de incidência.

Código	Região ¹	Fus ² (%)	FGSC ³ (%)	DON (µg/g) ⁴	15-ADON (µg/g)	3-ADON (µg/g)	DON total (µg/g)
4	FO	10	1,5	3,3	11,2	18,95	33,45
5	FO	7,5	0	4,5	8,3	16,75	29,55
6	FO	5,0	0	9,5	9,45	8,45	27,4
9	FO	4,0	0	5	7,75	13,55	26,3
15	CAM	0	0	9,05	10,95	ND ⁵	20
16	CAM	0	0	4,65	9,95	ND	14,6
17	CAM	1,0	0	6,05	9,1	12,7	27,85
24	CAM	0	1,5	4,65	3,8	5,8	14,25
29	CAM	0,5	3,0	9,10	8,75	12,05	29,9
36	PCE	6,0	1,5	5,10	11,85	3,25	20,2
37	PCE	8,0	0	ND	15,35	9,1	24,45
50	PCE	1,5	1,5	6	ND	ND	6
56	PCE	11	1,5	4,50	11,1	10,5	26,1
68	ZS	0	0	7,3	6,55	11,4	25,25
93	DC	0,5	0	7,65	10,75	2,6	21
Total	—	3,66	0,7	5,75	8,99	8,34	23,08

¹ Regiões orizícolas definidas pelo Instituto Riograndense do Arroz (IRGA): FO= Fronteira Oeste; CAM= Campanha; PCE= Planície Costeira Externa; ZS= Zona Sul; DP= Depressão Central ² Fus= *Fusarium* spp.; ³ FGSC= complexo de espécies *Fusarium graminearum*; ⁴ µg/g= ppm; ⁵ ND= Não Determinado.

Através da análise de correlação foi observado que existe, de modo geral, uma correlação negativa entre a frequência das espécies e a produção de micotoxina. É possível observar que altos níveis de *Fusarium* spp. possuíram uma boa correlação com a produção de 15-ADON e o complexo de espécies *F. graminearum* uma correlação negativa com a produção de micotoxinas (Tabela 7).

TABELA 7. Análise de correlação de Pearson (r) entre a incidência de *Fusarium* spp. (Fus) e complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFg) e a produção de micotoxinas em sementes de arroz da safra 2011/12. Áreas com fundo cinza apresentam os valores de r (valores em negrito com $P < 0.05$) e a área com fundo branco os valores de probabilidade.

Variáveis	Fus ¹	FGSC ²	Fus_total ³	DON ⁴	15-ADON ⁵	3-ADON ⁶	DON_total ⁷
Fus	—	0,111	0,974	-0,508	0,503	0,368	0,486
CEFg	0,702	—	0,332	-0,084	-0,103	0,001	-0,028
Fus_total	<0,001	0,227	—	-0,493	0,451	0,354	0,455
DON	0,063	0,776	0,073	—	0,042	-0,345	0,037
15-ADON	0,067	0,723	0,106	0,890	—	-0,072	0,170
3-ADON	0,238	0,997	0,258	0,299	0,825	—	0,831
DON_total	0,065	0,921	0,088	0,900	0,560	<0,001	—

¹ Fus= *Fusarium* spp.; ² FGSC = complexo de espécies *Fusarium graminearum*; ³ Fus_total= Soma de *Fusarium* spp+*Fusarium graminearum*; ⁴ DON= Deoxinivalenol; ⁵ 15-ADON=15-Acetil-deoxinivalenol; ⁶ 3-ADON=3-Acetil-deoxinivalenol; ⁷ DON_total= Soma de 15-ADON+3-ADON.

4.1.3 Identificação molecular para complexo/espécies

No total, 200 isolados purificados foram obtidos e analisados. Desses, 133 identificados por morfologia como pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC) foram submetidos à genotipagem multilocus. No entanto, apenas 86 foram confirmados como sendo do FGSC e 34 identificados como de outros complexos de espécies após sequenciamento do gene TEF1- α e para o restante dos 13 isolados o sequenciamento não funcionou devido a baixa qualidade do DNA. Para os isolados que amplificaram na genotipagem multilocus, foram identificadas quatro espécies do FGSC com dois dos três genótipos tricotecenos (Tabela 8).

Dos 67 isolados identificados como pertencentes a outros complexos, por morfologia, 25 foram enviados para sequenciamento na USP, 13 foram confirmados como pertencentes a outros complexos (Tabela 9) e 11 foram identificados como do FGSC, especificamente *F. asiaticum* e somente um isolado não funcionou devido à má qualidade do DNA.

TABELA 8. Número de isolados obtidos de sementes de arroz irrigado do Brasil e identificados para uma das espécies do complexo de espécies *Fusarium graminearum* e genótipos tricotecenos por metodologia de genotipagem multilocus e por sequenciamento do gene TEF 1- α .

Espécie filogenética ¹	Número de isolados			Total
	3-ADON ²	15-ADON ³	NIV ⁴	
<i>F. asiaticum</i>	-	-	62	69
<i>F. graminearum</i>	-	14	-	14
<i>F. cortaderiae</i>	-	-	13	13
<i>F. meridionale</i>	-	-	1	1
Total	-	14	82	97

¹ Espécies descritas por O'Donnell *et al* (2004); ² 3-ADON=3-Acetil-deoxinivalenol; ³ 15-ADON=15-Acetil-deoxinivalenol; ⁴ NIV=Nivalenol.

Na PCR multiplex para genotipagem para potencial de produção tricotecenos para esses isolados, isolados foram identificados como do genótipo NIV. As espécies identificadas como pertencentes ao FGSC ocorreram predominantemente no RS (Apêndice1).

TABELA 9. Número de isolados por complexo de espécies, estabelecidos conforme O'Donnell 2013 e seus respectivos valores médios de identidade de acordo com sequencias de referencia de TEF 1- α , disponíveis no GenBank-NCBI.

Complexo de espécies	Número de isolados	Identidade média (%)
<i>Fusarium chlamydosporum</i> species complex (FCSC)	25	99%
<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> species complex (FIESC)	13	98%
<i>Fusarium fujikuroi</i> species complex (FFSC)	10	98%
Total	48	

Nota-se que o número de isolados foram identificados como pertencentes ao complexo de espécies *F. chlamydosporum* (FCSC), seguindo dos demais complexos, *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium fujikuroi* (FFSC), todos apresentaram altos valores de identidade.

4.1.4 Produção de tricotecenos por isolados do FGSC

Para os sete isolados selecionados da espécie filogenética *F. asiaticum* oriundos do arroz, identificados com o genótipo NIV, todos apresentaram o quimiotipo NIV, ou seja, produzido somente NIV no cultivo em grãos de arroz. A produção foi variada entre os isolados, de 5 a 58 µg/g com média de 29 µg/g.

Os dois isolados da espécie *F. graminearum*, oriundos do arroz, genotipados como produtores de 15-ADON, produziram as duas formas acetiladas 15-ADON e 3-ADON, concordando com a análise molecular. No entanto, os dois isolados de *F. cortaderiae* e um de *F. meridionale*, identificados como do genótipo NIV não produziram níveis detectáveis de tricotecenos.

Os três isolados identificados como *F. asiaticum*, oriundos do trigo, produziram DON e as duas formas acetiladas, não concordando com a genotipagem, que tinha identificado esses isolados como do genótipo NIV (Tabela 10).

TABELA 10. Produção de tricotecenos por isolados de espécies do complexo de espécies *Fusarium graminearum* em cultivos em grãos de arroz quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Cód.	Hospedeiro	Esp. ¹	Genótipo ²	Tricotecenos (µg/g)			
				DON	15-ADON	3-ADON	NIV
09Ar004	Arroz	Fasi	NIV	- ³	-	-	19,4
09Ar021	Arroz	Fasi	NIV	-	-	-	20,6
09Ar024	Arroz	Fasi	NIV	-	-	-	84,1
09Ar026	Arroz	Fasi	NIV	-	-	-	8,2
10Ar001	Arroz	Fasi	NIV	-	-	-	58,4
12Ar031	Arroz	Fasi	NIV	-	-	-	4,7
12Ar037	Arroz	Fasi	NIV	-	-	-	6,4
12Ar030	Arroz	Fgra	15-ADON	-	41,0	15,0	-
12Ar036	Arroz	Fgra	15-ADON	-	11,8	6,03	-
12Ar044	Arroz	Fcor	NIV	-	-	-	-
12Ar132	Arroz	Fcor	NIV	-	-	-	-
12Ar010	Arroz	Fmer	NIV	-	-	-	-
10Tr025	Trigo	Fasi	NIV	-	11,0	6,9	-
11Tr025	Trigo	Fasi	NIV	6,7	9,4	-	-
11Tr026	Trigo	Fasi	NIV	15,2	6,8	6,8	-
Total				10,9	16,0	87	28,8

¹ Espécies descritas por O'Donnell *et al* (2004) Fasi= *Fusarium asiaticum*; Fmer= *Fusarium meridionale*; Fgra= *Fusarium graminearum*; Fcor= *Fusarium cortaderiae*; ² Genótipo tricoteceno, 3-ADON=3-Acetil-deoxinivalenol, 15-ADON=15-Acetil-deoxinivalenol; NIV=Nivalenol;

³ Não determinado.

4.1.5 Ensaios de patogenicidade

Nos ensaios de patogenicidade conduzidos em plantas de arroz, foi analisado a incidência do fungo inoculado nas sementes, aquelas inoculadas com *F. asiaticum*, oriundo do arroz, apresentaram em média 41% de incidência, seguida das inoculadas com *F. asiaticum* oriundo do trigo com 13% e 10% das inoculadas com *F. graminearum* também oriundo do trigo (Tabela 11).

As demais sementes inoculadas apresentaram níveis não detectáveis de tricotecenos, com exceção das inoculadas com um isolado de *F. asiaticum* oriundo do trigo, que produziu somente 3-ADON, não conferindo com o genótipo identificado molecularmente que havia sido NIV (Tabela 11).

Da mesma forma, foram detectados nos grãos oriundos das inoculações em plantas de arroz isolados de *F. chlamydosporum* como produtores de tricotecenos (Tabela 11).

Nesse estudo os isolados produziram em média 18 µg/g DON (equivalente a 1800 µg/kg) incluindo suas formas acetiladas 15-ADON e 3-ADON, no entanto os valores de incidência do fungo detectado nas sementes após a colheita foram baixos, chegando a no máximo 9%. (Tabela 11).

No entanto observou-se que nas espécies que produziram maior percentual de sementes infectas, como resultado da maior agressividade, essas sementes foram prejudicadas em sua germinação (Figura 5C).

TABELA 11. Incidência das espécies e concentração de tricotecenos após a inoculação de isolados pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium graminearum* e *Fusarium chlamydosporum* quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Código	Espécie ¹	Origem	Genótipo	Incidência ³ (%)	DON µg/g ² (média)	15- ADON	3-ADON
09Ar003	Fchla	arroz	—	4	8,43	8,6	33,53
09Ar008	Fchla	arroz	—	14	9,16	11,45	32,75
09Ar021	Fasi	arroz	NIV	61	ND	ND	ND
09Ar024	Fasi	arroz	NIV	20	ND	ND	ND
11Tr025	Fasi	trigo	NIV	17	ND	ND	17,35
11Tr026	Fasi	trigo	NIV	8	ND	ND	ND
B8	Fgra	trigo	15-ADON	10	ND	ND	ND

¹ F. chla= *Fusarium chlamydosporum*; F.asi= *Fusarium asiaticum*; F.gra= *Fusarium graminearum*.

² µg/ml= ppm

³ Incidência avaliada em 100 sementes.

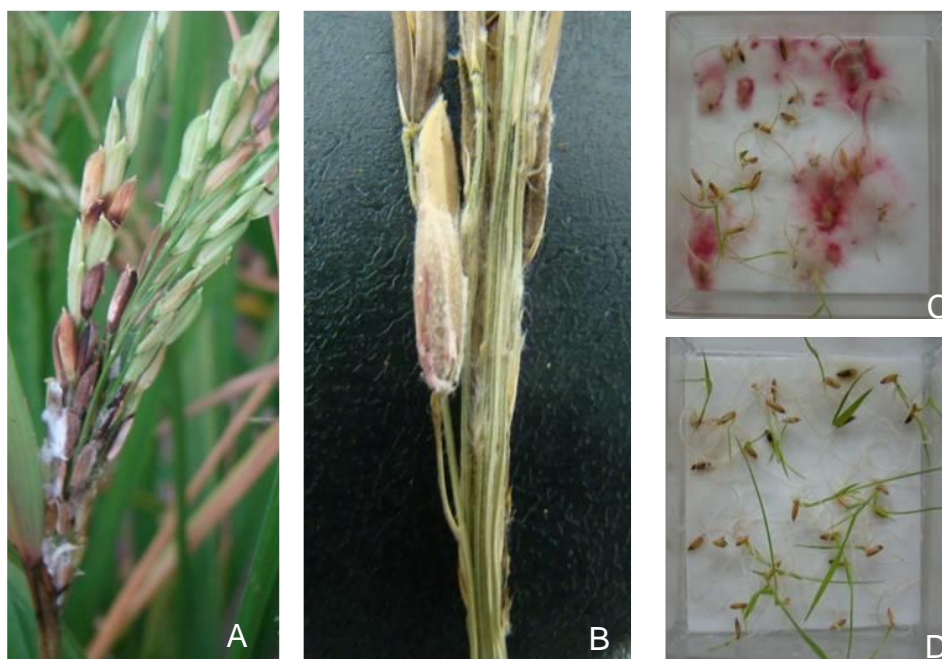


FIGURA 5. Sintomas induzidos por *Fusarium* inoculado em panículas de arroz. Plantas inoculadas com isolado *F. chlamydosporum* (A), semente contaminada com *F. asiaticum*, oriundo do arroz, observada durante a colheita (B), baixo percentual de germinação em sementes inoculadas com *F. asiaticum*, oriundo do arroz (C), sementes inoculadas com *F. asiaticum*, oriundo do trigo (D).

Nos ensaios de patogenicidade conduzidos em plantas de trigo, todos os isolados produziram os sintomas típicos da doença aos cinco dias após a inoculação. No entanto, a severidade avaliada aos oito dias após a inoculação foi variada entre os isolados (Figura 6). O isolado *F. asiaticum*, oriundo do arroz (09Ar024) foi o menos agressivo, com severidade média de 28%. O mais agressivo, com severidade média de 76%, foi o isolado *F. asiaticum*, oriundo do trigo (11Tr026) (Tabela 12).

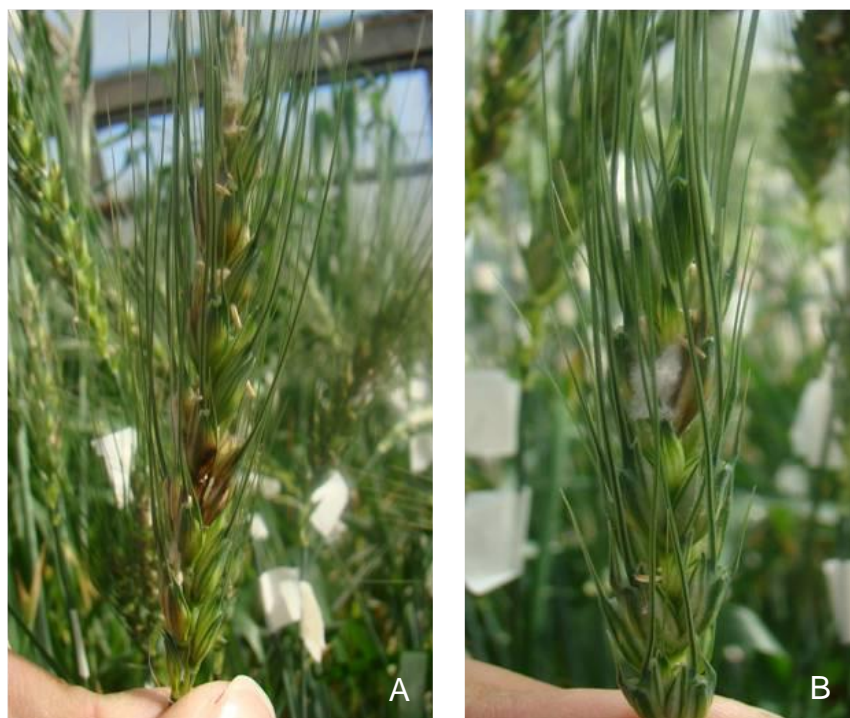


FIGURA 6. Severidade observada oito dias após a inoculação em plantas de trigo da cultivar Guamirim. (A) Isolado de *F. asiaticum* oriundo do trigo, (11Tr026) (B) Isolado de *F. asiaticum* oriundo do arroz, (09Ar024).

Dos grãos maduros que foram analisados quanto à concentração de tricotecenos, nenhum deles apresentou níveis detectáveis de DON. Para os grãos provenientes da inoculação com *F. asiaticum* oriundos do arroz não foi detectada nenhuma micotoxina, diferentemente das inoculações com isolados oriundo do trigo, onde foram detectado níveis de NIV variando de 4 a 17 $\mu\text{g/g}$. O mesmo aconteceu com o isolado *F. graminearum* oriundo do trigo, previamente genotipado como produtor de 15-ADON, sendo detectada as duas formas acetiladas 15-ADON e 3-ADON nos grãos das espigas inoculadas com esse isolado (Tabela 12).

TABELA 12. Severidade e concentração média de tricotecenos em tratamentos com inoculação de espigas de trigo com isolados de espécies do complexo de espécies *Fusarium graminearum* oriundos do arroz e do trigo.

Código	Espécie ¹	Hospedeiro de Origem	Genótipo ²	Severidade (%) ²	15-ADON $\mu\text{g/g}^3$	3-ADON $\mu\text{g/g}^3$	NIV $\mu\text{g/g}^3$
09Ar021	Fasi	arroz	NIV	70	— ⁴	—	—
09Ar024	Fasi	arroz	NIV	28	—	—	—
11Tr025	Fasi	trigo	NIV	48	—	—	4,46
11Tr026	Fasi	trigo	NIV	76	—	—	7,56
B8	Fgra	trigo	15-ADON	55	17,16	15,26	—
Média				55	17,16	15,26	6,01

¹ Espécies descritas por O'Donnell *et al* (2004) Fasi= *Fusarium asiaticum*; Fgra= *Fusarium graminearum*; ² Genótipo tricoteceno, 15-ADON=15-Acetil-deoxinivalenol; NIV=Nivalenol; ³ $\mu\text{g/g}$ = ppm; ⁴ Não determinando.

4.2. Discussão

No levantamento realizado nesse trabalho foi observada uma baixa incidência de *Fusarium* nas amostras analisadas. Estudos anteriores de identificação de fungos em sementes de arroz conduzidos no estado do Rio Grande do Sul também mostraram baixa incidência média de *Fusarium spp.*, sendo de 2,7% em 162 amostras dos anos de 2005/2006 (Farias *et al.*, 2007) e <2% em 350 amostras de vários anos da década de 1990 (Franco *et al.*, 2001).

A identificação de dois grupos de *Fusarium* com base na morfologia das colônias sobre sementes foi uma forma conveniente para uma quantificação rápida e visual das espécies do complexo *F. graminearum* (FGSC) devido à existência de características típicas de colônia sobre semente, podendo-se citar a pigmentação rosa-avermelhada e formação de abundante micélio aéreo. No entanto, para diversos isolados a identificação morfológica se mostrou equivocada, quando confrontada com as identificações moleculares. Diversos isolados identificados como FGSC falharam na técnica de detecção por genotipagem multilocus específica para as espécies desse complexo, mas, por sequenciamento gênico, puderam ser identificadas como sendo pertencente e outros complexos de *Fusarium*. Por outro lado, diversos isolados identificados como de outros complexos, foram identificados como do FGSC.

Segundo Leslie & Summerell (2006), identificações acuradas com base na morfologia para *Fusarium* exigem experiência do analista e o crescimento em meios de cultura apropriados para o desenvolvimento das características morfológicas que permitem a identificação acurada. O procedimento demanda tempo, espaço e nem sempre garante 100% de acerto nas identificações, o que, para identificações de rotina em testes de patologia de sementes se tornam inviáveis. Tal fato ajuda a explicar porque a maioria dos estudos de detecção de fungos em sementes relata *Fusarium* apenas em nível de gênero, especialmente na cultura do arroz onde, segundo os resultados aqui obtidos, ocorre uma ampla gama de espécies cuja morfologia é bastante similar.

Embora a incidência de *Fusarium* tenha sido baixa nas sementes de arroz, especialmente para as espécies do FGSC, reconhecidamente toxigênicas, os tricotecenos foram detectados em níveis relativamente altos. As correlações entre as variáveis de incidência de *Fusarium* spp. e FGSC (baseado na presença ou ausência da colônia) e as concentrações dos tricotecenos foram positivas ou mesmo negativas e em sua maioria não significativas. Fracas correlações entre incidência de *Fusarium* e concentração de tricotecenos também já foram encontradas em outros estudos (Sampietro *et al.*, 2011; Dors *et al.*, 2011).

Destaca-se, assim, que a avaliação da incidência, usando o método do papel de filtro (Blotter Test), tem pouco valor preditivo da concentração de micotoxinas. Diversos fatores podem contribuir para essa falta de correlação, podendo-se citar a baixa sobrevivência de alguns fungos fitopatogênicos que, quando inviáveis, podem não ser detectados nesse teste. Para *Fusarium graminearum*, a sobrevivência em sementes de trigo foi determinada em 12 meses, considerando a redução da viabilidade em função do tempo de armazenamento (Telles-Neto *et al.*, 2007).

Outras limitações do teste do papel de filtro pode estar relacionada com a competição quando da ocorrência de múltiplos organismos na semente, onde, fungos com

rápido crescimento podem inibir o crescimento de outro ou mesmo exercer algum tipo de antagonismo. Essa relação foi observada em sementes de trigo na Argentina, onde os autores observaram uma correlação negativa entre as incidências de *Alternaria alternata* e *Fusarium graminearum* (González *et al.*, 1998)

Enquanto que os organismos micotoxigênicos podem perder sua viabilidade, dificultando sua detecção, as micotoxinas são metabólitos que tem alta estabilidade na matriz sendo inclusive de difícil remoção (Furlong *et al.*, 1995). Assim, a relação fungo/micotoxina é complexa e depende de fatores múltiplos que atuam por um longo período desde a infecção da planta até a colheita e o armazenamento, podendo alterar a dinâmica do acúmulo de micotoxina nos grãos. Alguns autores tem demonstrado correlações mais fortes e significativas entre alguns indicadores de biomassa fúngica, como ergosterol ou glicosamina, ou mesmo concentração de DNA fúngico utilizando “primers” com alvo em genes da síntese de tricotecenos (Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2012). Estudos futuros poderiam testar a utilidade de métodos moleculares como PCR em tempo real com alvo em genes da rota de tricotecenos de forma que se possa identificar os indicadores da contaminação do arroz com tricotecenos.

A concentração média de DON, por exemplo, de 5.750 µg/kg, foi bastante superior aos limites estabelecidos a legislação Brasileira (sete vezes mais). Segundo regulamentação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os níveis máximos tolerados de DON, com vigência para o ano de 2014, são 750 µg/kg. As 15 amostras analisadas quanto a presença dos tricotecenos foram obtidas de campos de produção de sementes no RS. Nessa região é comum a prática de aplicação de fungicidas para o controle de um complexo de doenças foliares. A literatura mostra que pode haver aumento na produção de DON em grãos de cereais oriundos de parcelas tratadas com fungicidas, especialmente as estrobilurinas, embora o controle da doença tenha sido satisfatório (Wegulo *et al.*, 2012). O estímulo à produção de DON estaria ligado ao

estresse ao crescimento do organismo dos fungos impostos por determinadas moléculas fungicidas (Hýsek *et al.*, 2005).

No RS, Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, (2012), encontraram níveis mais altos de DON em parcelas experimentais que receberam aplicação de fungicidas (84,3 µg/kg) do que em parcelas sem fungicidas (63,7 µg/kg). Os autores avaliaram a concentração de tricotecenos no endosperma, casca e farelo de arroz e observaram que nas amostras de endosperma do arroz submetido à parboilização os níveis de contaminação com DON foram mais elevados ($8 \mu\text{g kg}^{-1} \pm 17,1$) do que no arroz natural. A casca e farelo do arroz parboilizado apresentaram menor contaminação com micotoxinas do que o arroz natural, sugerindo que a parboilização favorece a migração de compostos para o interior do grão, resultando em menores teores nessas frações externas. No entanto, os valores encontrados em grãos de arroz oriundos de parcelas experimentais estavam dentro do limites estabelecidos pela ANVISA.

As determinações dos tricotecenos feitas no presente estudo foram determinadas nas sementes com casca. Um estudo feito por Desjardins *et al* (2000) verificou que a incidência de *Fusarium* diminuiu em 8% nas amostras quando a casca de sementes de arroz foi removida, o que levou os autores a sugerirem maior risco de contaminação com tricotecenos em grãos com casca.

Mesmo para espécies toxigênicas de *Fusarium* que causam doenças e são encontradas em alta incidência (>20%) em grãos de cereais, como por exemplo, a giberela causada por espécies do complexo *F. graminearum* em trigo e cevada, não são comuns relatos de valores de micotoxinas simialres àqueles aqui relatados para as amostras de arroz. Em um estudo no RS, Del Ponte *et al.* (2012) analisaram amostras de trigo, oriundas de 38 municípios e de três safras de trigo, observando níveis médios de contaminação com DON e NIV de 540 e 337 µg/kg, respectivamente. Também no Brasil, Furlong *et al* (1995) analisaram 20 amostras de um experimento de campo realizado com duas variedades de

trigo no estado de São Paulo, os níveis de NIV variaram de 160-400 µg/kg, enquanto os de DON de 470-590 µg/kg.

O uso das técnicas moleculares mostrou uma grande diversidade de espécies ou linhagens de *Fusarium* associadas às sementes de arroz produzidas no Brasil. Os isolados apresentaram similaridade com sequências do gene TEF1- α para 19 espécies ou linhagens conhecidas e agrupadas em quatro complexos de espécies. Outros estudos para identificação de espécies de *Fusarium* em sementes de arroz também mostraram a ocorrência de múltiplas espécies do gênero, especialmente aquelas do complexo *F. fujikuroi* (Desjardins *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009; Amatulli *et al.*, 2010; Wulff *et al.*, 2010).

A maioria dos isolados analisados por genotipagem multilocus e similaridade de sequências para o FGSC foram identificados como *F. asiaticum*, além de outras três espécies do complexo somadas em proporção que somada ficou abaixo de 15%. Esse resultado concorda com a literatura que mostra ser *F. asiaticum* uma espécie dominante em arroz ou em outros cereais de inverno cultivados nos países asiáticos e em regiões com rotação desses cereais com cultivos de arroz.

Em um estudo conduzido na Coreia do Sul os autores avaliaram sementes de arroz oriundas de 48 campos onde foram observados sintomas de uma fusariose, e identificaram uma alta incidência de espécies do FGSC (90%), sendo *Fusarium asiaticum* a espécie dominante (Lee *et al.*, 2009).

Fusarium asiaticum tem sido relatado com maior frequência na Ásia e como espécie dominante em cereais cultivados no Japão (Qu *et al.*, 2008) e na China (Gale *et al.*, 2002), onde foram também identificadas *F. meridionale*, *F. graminearum* e *F. boothii*, também do FGSC, mas em menor prevalência (Yang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). No entanto, a ocorrência de *F. asiaticum* não está limitada ao continente asiático, já que existem relatos dessa espécie em trigo no Uruguai (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013), no

Brasil (Del Ponte *et al.*, 2012) e nos Estados Unidos (Gale, *et al.*, 2011), sendo esse o primeiro relato de *F. asiaticum* em arroz fora do continente Asiático.

Na determinação dos tricotecenos produzidos por isolados cultivados em substrato artificial, os isolados *F. asiaticum* obtidos do arroz produziram a micotoxina predita pelo genótipo, ou seja, nivalenol. Já isolados *F. asiaticum* do trigo, produziram somente DON e as formas acetiladas, discordando do esperado pela genotipagem que era NIV e de estudos na Ásia que mostraram que *Fusarium asiaticum* do trigo segregaram para genótipos NIV e 3-ADON, com predominância do primeiro (Karugia *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

Apesar de algumas inconsistências entre os resultados de genotipagem e quimiotipagem (Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011; Sampietro *et al.*, 2012), a determinação do genótipo tricoteceno vem sendo utilizada rotineiramente como informação preditiva do potencial toxigênico das populações do FGSC (Scoz *et al.*, 2009; Pasquali *et al.*, 2010; Reynoso *et al.*, 2011; Schmale *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2012). O conhecimento do perfil toxigênico das populações do FGSC é fundamental para o entendimento do risco de contaminação dos grãos com diferentes micotoxinas. A partir dos dados obtidos nesse estudo, pode-se inferir que possivelmente as populações de *F. asiaticum* do trigo e arroz do Brasil, com base nos isolados amostrados, estão separadas pela característica toxigênica, podendo constituir populações distintas.

A dominância de *F. asiaticum* em arroz, segundo vários estudos, levou autores a sugerirem a hipótese de adaptação das populações do complexo a determinados hospedeiros (Lee *et al.*, 2009). Na Ásia, isolados *F. asiaticum* obtidos do trigo, predominaram em regiões rotações de trigo com arroz, sugerindo assim a influência de práticas culturais na dinâmica e distribuição das espécies (Zhang *et al.*, 2012). No Uruguai Umpiérrez-Failache *et al* (2013), relataram *F. asiaticum* em trigo em regiões tipicamente produtoras de arroz.

Nos ensaios de patogenicidade em plantas de arroz e trigo os resultados aqui apresentados corroboram com a hipótese de adaptação ao hospedeiro já que isolados de *F. asiaticum* do arroz mostraram-se mais agressivos em arroz do que *F. asiaticum* do trigo e *F. graminearum* do trigo, com base na maior incidência nas sementes.

Backhouse (2014), em um estudo de modelagem do efeito do clima sobre a distribuição de algumas espécies do FGSC (*F. graminearum*, *F. boothii* e *F. asiaticum*), sugere que a dominância de *F. asiaticum* em arroz está possivelmente relacionada com condições climáticas (temperatura e umidade), já que a maioria dos relatos dessa espécie foram em regiões mais quentes e chuvosas, coincidindo com áreas favoráveis ao cultivo do arroz. Inclusive, o autor discute que essa hipótese estaria apoiada pela falta de relato de *F. asiaticum* em arroz fora da Ásia, hipótese essa que pode ser refutada pelos resultados aqui apresentados uma vez que *F. asiaticum* predominou em áreas de cultivo subtropical e adaptadas à diversas culturas como o cereais de inverno.

A análise de tricotecenos nas sementes oriundas do ensaio de patogenicidade em plantas de arroz mostrou que isolados *F. asiaticum* não produziram micotoxinas. No entanto, os isolados de *F. chlamyosporum* avaliados produziram DON com níveis variando de 800 a 900 µg/kg, confirmando relatos anteriores de que fungos desse complexo seriam produtores de tricotecenos (O' Donnell *et al.*, 2009; Lincy *et al.*, 2013)

Nos ensaios em plantas de trigo os isolados *F. asiaticum*, oriundos do trigo, além de mais agressivos, com base na alta severidade, também produziram níveis detectáveis de NIV, concordando com o potencial toxigênico determinado pelo método molecular. Já os isolados *F. asiaticum* oriundos do arroz foram pouco agressivos e não produziram micotoxinas nos grãos de trigo. Evidencia-se, assim, que *F. asiaticum* do arroz não parece adaptado como patógeno adaptado ao trigo.

Além das espécies de FGSC determinadas para o maior número de isolados amostrados nesse estudo, devido ao direcionamento principal à esse complexo, outros três

complexos de espécies de *Fusarium* foram encontrados. Dentre esses, a maior diversidade de espécies dentro de um dos complexos foi observada para o complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*, muitas delas associadas ao bakanae.

Uma alta diversidade também foi encontrado por Wulff *et al* (2010) que encontraram populações de *F. andiazi*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* associadas com bakanae em arroz na África e na Ásia. Resultado semelhante foi encontrado por Desjardins *et al.* (2000) no Nepal, onde espécies desse complexo foram mais frequentes no arroz em amostras do ano de 1997. Hsuan *et al.* (2011) relataram três espécies desse complexo em arroz na Malásia, no entanto associando somente a espécie *F. verticillioides* como causador da bakanae. Na Índia, um estudo envolvendo o levantamento de espécies de *Fusarium* em 90 amostras de arroz com casca, detectou em maior prevalência *F. verticillioides*, alertando para a contaminação com fumonisina, tipicamente produzida por essa espécie

Considerando que várias das espécies do complexo *F. fujikuroi* são produtoras de fumonisinas (B1, B2, etc), trabalhos futuros deveriam ter como alvo esse grupo de micotoxinas nas amostras de arroz produzidas no Brasil, embora a fumonisina não seja regulamentada atualmente para arroz e subprodutos (Anvisa, Resolução - RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011). Estudos futuros com esses isolados do complexo *F. fujikuroi* do arroz poderiam analisar o potencial toxigênico com base na presença de genes da síntese de fumonisinas bem como a detecção da micotoxina em cultivos artificiais.

Pela primeira vez foram identificadas espécies e linhagens do complexo *F. chlamydosporum* em sementes arroz no Brasil, com sequências similares à uma linhagem (linhagem 1) das cinco espécies/linhagens sugeridas por O'Donnel *et al* (2009) para uma coleção de isolados obtidos de ambientes clínicos humano e veterinário de vários estados americanos, sendo apenas uma delas atribuído um epíteto (*F. nelsonii*) para a qual os isolados obtidos nesse trabalho não apresentaram similaridade. Ainda, foi confirmada a

habilidade desse grupo para a produção de tricotecenos detectados nos grãos provenientes das panículas de arroz inoculadas com dois isolados da linhagem 1 do complexo. Os isolados do complexo *F. chlamydosporum* não foram analisados quanto ao genótipo tricoteceno, o que seria interessante de ser conduzido futuramente, porém utilizando *primers* mais genéricos da síntese tricotecenos como porções do gene *Tri5* (Ward *et al.*, 2002; Lincy *et al.*, 2013)

Lincy *et al* (2013) em sementes de sorgo cultivado na Índia identificaram *F. nelsonii* como produtor de DON, concordando com informações anteriores sobre esse complexo (O'Donnell *et al.*, 2009). No Nepal, Desjardins *et al* (2000) relataram a ocorrência de *F. equiseti*, *F. semitectum*, além de *F. chlamydosporum* como produtores de micotoxinas.

O quarto complexo encontrado nesse estudo foi o *F. incarnatum-equiseti*. Nesse grupo, as espécies identificadas também são relatadas em alguns estudos como produtoras de tricotecenos e zearalenonas (Summerell *et al.*, 2011). A produção de tricotecenos também foi observada por Desjardins *et al* (2000) no Nepal quando identificaram *F. equiseti* em sementes de arroz. No trabalho de Lincy *et al* (2011) também fizeram o relato de um isolado de *F. equiseti* produtor de DON e NIV.

Assim, os altos níveis de DON encontrados nas amostras de grãos podem resultar de um complexo de espécies toxigênicas associadas ao arroz, e não apenas por *F. graminearum*, conforme hipotetizado inicialmente nesse estudo.

Por fim, é importante destacar que as identificações para as espécies foram baseadas na similaridade com sequências conhecidas usando apenas o gene *TEF1- α* , sendo algumas similaridades baixas devido a baixa qualidade do sequenciamento. De forma a não deixar dúvidas sobre a identificação das espécies seria apropriado sequenciar novamente alguns isolados para esse e outros genes e proceder a uma análise filogenética, a qual poderia posicionar de maneira mais clara os isolados nos grupos taxonômicos, podendo

inclusive revelar novas espécies. Além disso, a caracterização morfológica detalhada de isolados representantes dessa espécie poderia ser uma ferramenta auxiliar e elucidativa para se verificar a presença de marcadores morfológicos.

5 CONCLUSÕES

A incidência de *Fusarium* em sementes de arroz irrigado no Brasil, determinada com base na presença/ausência de colônia em sementes, é baixa e não prediz os altos níveis de tricotecenos em amostras oriundas de lavouras de produção de sementes.

Uma alta diversidade de espécies de *Fusarium*, distribuídas em pelo menos quatro complexos de espécies, ocorre em sementes arroz no Brasil.

Fusarium asiaticum é a espécie dominante dentre as do complexo *F. graminearum* em arroz no Brasil e aptas a produzirem o tricoteceno nivalenol.

Populações de *Fusarium asiaticum* associados ao arroz e trigo se diferem por sua especialização ou adaptação (*fitness*) patogênica à seus respectivos hospedeiros de origem e potencial toxigênico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H. K. *et al.* Natural occurrence of fumonisins in rice with *Fusarium* sheath rot disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, n.22-25, 1998.
- AMATULLI, M. T. *et al.* Conventional and real-time PCR for the identification of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum* from diseased rice tissues and seeds. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 134, n. 2, p. 401-408, 2012.
- ANVISA. Resolução RDC 7. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos., constante do Anexo desta Resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, página 72, de 26 de fevereiro de 2011.
- ASTOLFI, P. *et al.* Complexo *Fusarium Graminearum*: taxonomia, potencial toxigênico e genética populacional na era molecular. **RAPP**, Cayenne, v. 18, p. 78-120, 2010.
- ASTOLFI, P. *et al.* Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 148, p. 197-201, 2011.
- ASTOLFI, P. *et al.* Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathology**, London, p.61, 289–295. 2012.
- BACKHOUSE, D. Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. **European Journal Plant Pathology**, London, v.139, p. 161-173, 2014.
- BAIRD, N.A. *et al.* Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. **PloS one**, San Francisco, v. 3, n. 10, p. e3376, 2008.
- BARCO, L. *et al.* Fluoroquinolone resistance detection in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Luminex MAP Technology. **Foodborne Pathogens And Disease**, New Rochelle, v.7, n. 9, 2010.
- BOTTALICO, A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. **Journal of Plant Pathology**, London, v. 80, n. 2, p. 85-103, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 365 p.

BRIOSO, P. S. T. *et al.* Uso atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia. Parte I - Aplicações em fitopatologia e vetores. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 79-119, 2001.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 16, p.95-101, 2007.

CARTER, L. L. A.; LESLIE, J. F.; WEBSTER, R. K. Population Structure of *Fusarium fujikuroi* from California Rice and Water Grass. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 98, n. 9, p. 992-998, 2008.

CHAMBERLAIN, J.S. *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, London, v.16, p. 11141-11156. 1988.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento, maio 2011. Brasília - DF: CONAB, 2011.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamentos de safra. Acomp. safra bras. grãos, v. 1 – Safra 2013/14, n. 5. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_11_15_22_20_boletim_graos_fevereiro_2014.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2014.

CRESPO, N. C. **Diversidade Genética de Isolados do Agente Etiológico da Fusariose do Abacaxizeiro no Brasil**. 2010. 36 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

DE BÔER, S. H.; ELPHINSTONE, J. G.; SADDLER, G. S. **Molecular detection strategies for phytopathogenic bacteria**. In: BIOTECHNOLOGY and plant disease management. Oxford: Oxford Press, p.165-166. 2007.

DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIÁLE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 132, p. 1087-1091, 2012.

DEL PONTE, E. M. *et al.* Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex in Brazil shows high diversity and changes in species prevalence affected by host and geographic region. In: European *Fusarium* Seminar, 12, 2013, Bordeaux. Proceedings...Bordeaux: INRA, 2013. P. 150.

DESJARDINS, A.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S.P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. **Microbiological reviews**, Washington v. 57, n. 3, p. 595-604, 1993.

DESJARDINS, A. E. *et al.* *Fusarium* species from nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1020-1025, 2000.

DESJARDINS, A. Trichothecenes. In.: Desjardins, A. (Ed.). **Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology**. The American Phytopathological Society, 2006, p. 13–64.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, Egham, UK, v.19, p.11-15, 1987.

DORS, G. C.; BIERHALS, V. S.; FURLONG, E. B. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. Arroz parboilizado: composição química e ocorrência de micotoxinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 172-177, 2011.

ENGELHARDT, G.; BARTHEL, J. ; SPARRER, D. Fusarium mycotoxins and ochratoxin A in cereals and cereal products: results from the Bavarian Health and Food Safety Authority in 2004. **Molecular nutrition & food research**, Germany, v. 50, n. 4-5, p. 401-405, 2006.

FANDOHAN, Pascal *et al.* Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 52, n. 22, p. 6824-6829, 2004.

FAO. **ProdSTAT; Consumption; TradeSTAT**. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 15 set. 2013

FAO. **Statistical Database 2012**. Disponível em: <http://www.planetaarroz.com.br/site/noticias_detalhe.php?Noticia=12188>. Acesso em: 25 set de 2013.

FARIAS, C. R. J.*et al.* Incidência de fungos associados a sementes de arroz em seis regiões produtoras do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.4, p.487-490, out-dez, 2007.

FRANCO, D. F. *et al.* Fungos associados a sementes de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7 n 3, p.235-236, set-dez, 2001.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological research**, Cambridge, n. 2, p. 231-240, 2008.

FURLONG, E. B. *et al.* Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, The Hague, v. 131, n. 3, p. 185-190, 1995.

GALE, L. R. *et al.* Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in eastern China. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 12, p. 1315-1322, 2002.

GALE, L. R. *et al.* Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in southern Louisiana. **Phytopathology**, St. Paul, v. 101, p. 124-134, 2011.

GARDA, J.; MACEDO, R. M.; FURLONG, E. B. Determinação De Tricotecenos em Cerveja e Avaliação De Incidência no Produto Comercializado No Rio Grande Do Sul. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p. 657-663, out.-dez. 2004.

GEISER, D. *et al.* FUSARIUM-ID v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 110, p. 473-479, 2004.

GEISER, D. M. *et al.* One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, St. Paul, v. 103, n. 5, p. 400-408, 2013.

GILBERT, J.; HABER, S. Overview of some recent research developments in *Fusarium* head blight of wheat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 35, p. 149-174, 2013.

GONZÁLEZ, H. H. L. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinian durum wheat. **Mycopathologia**, The Hague, v. 144, n. 2, p. 97-102, 1998.

GOSWAMI, R. S. ; KISTLER, H. C. Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, n 12, p.1397-404, 2005.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. *et al.* Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1244-1249, 2012.

HSUAN, H.M.; SALLEH, B.; ZAKARIA, L. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 10, p. 6722-6732, 2011.

HÝSEK, J. *et al.* Variation in the production of trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (DON) in spring barley varieties after treatment with the fungicides azoxystrobin and tebuconazole. **Plant Protection Science-Prague**, Czech Republic, v. 41, n. 2, p. 58, 2005.

ICHINOE, M. *et al.* Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1364-1369, 1983.

JURADO, M. *et al.* PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 681-689, 2006.

JURJEVIC, Z. *et al.* *Fusarium* species of the *Gibberella fujikuroi* complex and fumonisin contamination of pearl millet and corn in Georgia, USA. **Mycopathologia**, The Hague, v. 159, n. 3, p. 401-406, 2005.

KARUGIA, G. W. et la. Population structure of *Fusarium asiaticum* from two Japanese regions and eastern China. **Journal of General Plant Pathology**, Japan, v. 75, n. 2, p. 110-118, 2009.

KRSKA, R.; MOLINELLI, A. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 387, n. 1, p. 145-148, 2007.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.

KVAS, Marija *et al.* **Diversity and evolution of Fusarium species in the Gibberella fujikuroi complex**. 2009.

LÁDAY, M. *et al.* Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). **Molecular Diversity and PCR-detection of Toxicogenic Fusarium Species and Ochratoxicogenic Fungi**. Springer Netherlands, 2004. p. 545-550.

LEATHERHEAD FOOD RESEARCH. **Contaminants in Foodstuffs – An International Overview of Maximum Limits**. Leatherhead: Leatherhead Food Research, 2010. 2 v.

LEE, F.N.; RUSH, M.C. Rice sheath blight: a major rice disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.67, n.7, p.829-832, 1983.

LEE, Y. W. *et al.* Lineage composition and trichothecene production of *Gibberella zeae* population in Korea. In: YOSHIKAWA, T. (Ed.). **New horizons of mycotoxicology for assuring food safety**. Korea: Japanese Association of Mycotoxicology, 2004. p. 117-22.

LEE, J. *et al.* Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 3289-3295, 2009.

LEE, J. *et al.* Population structure of and mycotoxin production by *Fusarium graminearum* from maize in South Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 7, p. 2161-2167, 2012.

LESLIE, J. F; SUMMERELL, B. A. *Fusarium* laboratory workshops- A recent history. **Mycotoxin research**, Coverage, v. 22, n. 2, p. 73-74, 2006.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Blackwell IA, USA: Publishing, Ames, 2006. 388 p.

LINCY, S. V. *et al.* Natural occurrence of trichothecene-producing *Fusaria* isolated from India with particular reference to sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 27, n. 4, p. 981-989, 2011.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias analíticas para determinação das Fumonisinhas em milho e alimentos à base de milho. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 293-299, 2006.

LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; ALTOMARE, C. Chemotaxonomic observations on zearalenone and trichothecene production by *Gibberella zeae* from cereals in southern Italy. **Mycologia**, New York, v. 80, n.6, p.892-895, 1988.

MACEDO, E. C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência Da Embalagem e do Armazenamento Na Qualidade Sanitária De Sementes De Arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p.42-50, 2002.

MARASAS, W. F. O., P. E. NELSON, AND T. A. TOUSSOUN. **Toxigenic Fusarium species: identity and mycotoxicology**. Pennsylvania : Pennsylvania State University Press, 1984.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v.16, p. 47-51. 2002.

McMULLEN, M. *et al.* A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1712-1728, 2012.

MELLO, A. *et al.* Studies on " Bakanae" disease of Rice in Sao Paulo State. **O Biologico**, São Paulo, v.36, n.9, p. 235-240, 1970.

MILLER, J. D.; GREENHALGH, R. Trichothecene chemotypes of three Fusarium species. **Mycologia**, The Hague, v.83, n.2, p.121-30, 1999.

MUGRABI DE KUPPLER, A. L. *et al.* Genotyping and phenotyping of Fusarium graminearum isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 78-86, 2011.

MULÈ, G. *et al.* A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for the identification of Fusarium verticillioides, F. proliferatum and F. subglutinans. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 110, p. 495–502, 2004.

MURTHY, K. K.; RATI, E. R.; MANONMANI, H. K. Incidence of Fusarium in Rice from Karnataka, India. **Research Journal of Toxins**, New York, v. 1, n. 1, 2009.

NICHOLSON, P. *et al.* Detection and quantification of Fusarium culmorum and Fusarium graminearum in cereals using PCR assays. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.53, p.17-37. 1998.

NIEHAUS, E. *et al.* Characterization of the fusaric acid gene cluster in Fusarium fujikuroi. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, p. 1-14, 2014.

NIELSEN, L. K. *et al.* TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of F. graminearum and F. culmorum isolates in Danish small grain cereals. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 157, p. 384-392, 2012.

NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K. New Fusarium species and combinations within the Gibberella fujikuroi species complex. **Mycologia**, New York, p. 434-458, 1998.

NUNES, I. L. *et la.* Arroz Comercializado na Região Sul do Brasil: aspectos micotóxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, n.2 p.190-194, maio-ago. 2003.

NYVALL, R. F. Fusarium Head Blight of Cultivated and Natural Wild Rice (*Zizania palustris*) in Minnesota Caused by Fusarium graminearum and Associated Fusarium spp. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 2, p. 159-164, 1999.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular phylogenetics and evolution**, San Diego, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

O'DONNELL, *et al.* Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 41, p. 600–623, 2004.

O'DONNELL, K. *et al.* Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 45, n. 11, p. 1514-1522, 2008.

O'DONNELL *et al.* Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n.10, p. 3708-3718. 2009.

O'DONNELL, K. *et al.* Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010.

O. HENEGARIU, N.A.; HEEREMA, S.R.; DLOUHY, G.H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, Natick, v.23, n.3, 1997, p.504-511. 1997.

OU, S. H. **Rice diseases**. Kew, United Kingdom: Commonwealth Mycological Institute, 1985.

PAGE, B. T. *et al.* Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 9, p. 3167-3171, 2006.

PASQUALI, M. *et al.* Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 137, p. 246-253, 2010.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Blackie Academic & Professional, London, UK, 1997. 529p.

PURI, K. D.; ZHONG, S. The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, p. 1007-1014, 2010.

QU, B. *et al.* Comparison of genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium* head blight pathogens from China and Europe by SSCP and seedling assays on wheat. **Plant Pathology**, London, v.57, n.4, p.642-51, 2008.

QUARTA, A. *et al.* Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. **Food additives and contaminants**, London, v. 22, n. 4, p. 309-315, 2005.

RAMIREZ, M. L. *et al.* Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Giberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 115, n. 2, p. 139-148, 2006.

REID, L. M. *et al.* Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, Ithaca, v. 89, n. 11, p. 1028-1037, 1999.

REYNOSO, M. M. *et al.* Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 28, p. 444-448, 2011.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - an overview. **Int. J. Food Microbiology**, London, v.119, p.3-10, 2007.

SAMPIETRO, D. A., MARÍN, P., IGLESIAS, J., PRESELLO, D. A., VATTUONE, M. A., CATALAN, C. A. N., GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. **Fungal Biology**, Orlando, v. 114, p. 74-81, 2010.

SAMPIETRO, D. A. *et al.* Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* complex strains isolated from maize fields of northwest Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 153, n. 1, p. 229-233, 2012.

SAMSON, Robert A. *et al.* **Introduction to food-borne fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures. P.290, 1981.

SANTIN, E. *et al.* Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.185-190, 2000.

SARVER, B. A. L. *et al.* Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 12, p. 1096-1107, 2011.

SAVARD, Marc E. *et al.* Chlamydosporeol, a new metabolite from *Fusarium chlamydosporum*. **Mycopathologia**, The Hague, v. 110, n. 3, p. 177-181, 1990.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. 2002. Real Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 24, p.250-258, 2002.

SCHMALE, D. G. III *et al.* Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 909-917, 2011.

SCHOLLENBERGER, M. *et al.* Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 815, n. 1, p. 123-132, 1998.

SCOZ, L. B. *et al.* Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, p. 344-351, 2009.

SERRA, R. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A.** 2005. [399 p.] Tese (Doutorado) – Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2005. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/2579>>. Acesso em: 09 set 2012. 2005.

SOSBAI. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 5. **Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**, 27. Pelotas: SOSBAI, 2011. 164p

SPOLTI, P., DEL PONTE, E. M. Agressividade diferencial de espécies do complexo *Fusarium graminearum* em interação com o fungicida tebuconazole na redução do rendimento de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, p. 1569-1575, 2013.

STADLER, M. & KELLER, N.P. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. **Mycological research**, Cambridge, v. 112, n. 2, p. 127-130, 2008.

STARKEY, D. E. *et al.* Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene diversity. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 44, p. 1191-1204, 2007.

STEENKAMP, E.T; BRITZ, H.; COUTINHO, T.A; WINGFIELD, B.D; MARASAS, W.F.O.; WINGFIELD, M.J. Molecular characterization of *Fusarium* subglutinans associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, London, v.1, n.3, p.187- 193, 2000.

STUMPF, R. *et al.* *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 89-95, 2013.

SUGA, H.; KARUGIA, G. W.; WARD, T. & GALE, L. R. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. **Phytopathology**, Ithaca, v. 98, n. 2, p. 159-166, 2008.

SUGITA-KONISHI, Y.; NAKAJIMA, T. Nivalenol: the mycology, occurrence, toxicology, analysis and regulation. In.: **Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons**. RAI, M.; VARMA, A. (Ed.) Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. 2010.

SUMMERELL, Brett A. *et al.* *Fusarium* species associated with plants in Australia. **Fungal Diversity**, China, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2011.

SUZUKI, F.; KOBAYASHI, A. & NAKAJIMA, T. Simultaneous identification of species and trichothecene chemotypes of *Fusarium asiaticum* and *Fusarium graminearum* s. str. by multiplex PCR. **J. Gen. Plant. Pathol.** Japan, v 76, n. 1, p.31-6. 2010.

TELLES NETO, F.X.B.; REIS, E.M.; CASA, R.T. Viabilidade de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo durante o armazenamento. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.33, p.414-415, 2007.

TÓTH, B.; MESTERHÁZY, Á.; HORVÁTH, Z.; BARTÓK, T.; VARGA, M. & VARGA, J. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 113, n. 1, p. 35-45, 2005.

UMPIÉRREZ-FAILACHE, M. *et al.* Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 135-140, 2013.

VISENTINA, I., TAMIETTIA, G., VALENTINO, D., PORTIS, E., KARLOVSKY, P., MORETTI, A., CARDINALE, F. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. **Mycological research**, Cambridge, v. 113, p. 113-1145, 2009.

WAALWIJK, C. *et al.* Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 109, p. 743-754, 2003.

WANG, X.; CUI, Y.; FAN, F.; SONG, Y.; REN, J.; MENG, Q.; XU, W. & JIANG, L. Phylogenetic, Carbendazim Sensitivity and Mycotoxin Genotype Analyses of *Fusarium graminearum* Complex Species Isolated from Wheat Fusarium Head Blight in China. **Journal of phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 7-8, p. 576-578, 2010.

WARD, T. J.; BIELAWSKI, J. P., KISTLER, H. C.; SULLIVAN, E. & O'DONNELL, K. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 14, p. 9278-9283, 2002.

WARD, T. J.; CLEAR, R. M.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; GABA, D.; PATRICK, S.; STARKEY, D. E.; GILBERT, J.; GEISER, D. M. & NOWICKI, T. W. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, n. 4, p. 473-484, 2008.

WEGULO, S. N. Factors Influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. **Toxins**, Basel, v. 4, p. 1157-1180, 2012.

WULFF, E. G.; SORENSEN, J. L.; LÜBECK, K. F. N.; THRANE, U.; TORP, J. 2010. *Fusarium* spp. associated with Rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 649-657, 2010.

YANG, L.; LEE, T. V. D.; YANG, X.; YU, D. & WAALWIJK, C. *Fusarium* populations on chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles. **Phytopathology**, Ithaca, v. 98, n. 6, p. 719-727, 2008.

YLI-MATTILA, T. *et al.* A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, p. 841-852, 2009.

YOSHIDA, M.; NAKAJIMA, T. 2010. Deoxynivalenol and Nivalenol Accumulation in wheat Infected with *Fusarium graminearum* During Grain Development. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, vol.100, n. 8, p. 763-773. 2010.

ZACHARIASOVA M, LACINA O, MALACHOVA A, KOSTELANSKA M, POUTSKA J, GODULA M, HAJŠLOVA J. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, Amsterdam, v. 662, n. 1, p. 51-61, 2010.

ZHANG, H. *et al.* Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. **PlosOne**, San Francisco, v. 7, p. 1-13, 2012.

7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Coleção de isolados pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium graminearum*, obtidos durante as safras de 2008/9, 2010/11 e 2011/12, a partir de sementes e panículas de arroz. Identificadas as espécies e do genótipo tricoteceno por genotipagem de multilocus (MLGT) e por seqüenciamento do gene EF 1- α .

Isolado	Município	Estado	Espécie do complexo Fg	Quimiotipo
09Ar004	Itajaí	SC	<i>F. asiaticum</i>	NIV
09Ar021	Palmares do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
09Ar024	Palmares do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
09Ar025	Palmares do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
09Ar026	Palmares do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
09Ar027	Palmares do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
09Ar031	Palmares do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
09Ar032	Palmares do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
10Ar001	Cachoeirinha	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
10Ar003	Cachoeirinha	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
10Ar005	Cachoeirinha	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
10Ar006	Cachoeirinha	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar003	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar005	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar006	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar007	Cachoeirinha	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar009	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar011	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar024	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar026	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar029	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar031	Uruguaiana	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar032	Uruguaiana	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar033	Uruguaiana	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar034	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar035	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar037	Uruguaiana	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar040	Dom Pedrito	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar042	Dom Pedrito	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar045	Uruguaiana	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar047	Dom Pedrito	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar050	Dom Pedrito	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar052	Dom Pedrito	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar055	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar056	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar057	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar063	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar064	Mostardas	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar065	Mostardas	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV

Continuação APÊNDICE 1. Coleção de isolados pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium graminearum*, obtidos durante as safras de 2008/9, 2010/11 e 2011/12, a partir de sementes e panículas de arroz. Identificadas das espécies e do genótipo tricoteceno por genotipagem de multilocus (MLGT) e por seqüenciamento do gene EF 1- α .

Isolado	Município	Estado	Espécie do complexo Fg	Quimiotipo
12Ar066	Cachoeirinha	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar069	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar074	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar075	Cachoeira do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar077	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar079	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar084	Capivarí do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar085	Cachoeirinha	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar087	Dom Pedrito	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar113	Guaíba	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar114	Guaíba	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar115	Caçapava do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar116	Caçapava do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar117	Camaquã	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar127	Rio Pardo	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar128	Caçapava do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar129	Rio Pardo	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar130	Caçapava do Sul	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar131	Pelotas	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar133	Camaquã	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar134	Pelotas	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar135	Pelotas	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar136	Pelotas	RS	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar138	Nova Veneza	SC	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar139	Nova Veneza	SC	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar158	Criciúma	SC	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar160	Itajaí	SC	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar162	Nova Veneza	SC	<i>F. asiaticum</i>	NIV
12Ar008	Capivarí do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar012	Capivarí do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar018	Capivarí do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar041	Dom Pedrito	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar044	Uruguaiana	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar054	Capivarí do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar062	Capivarí do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar070	Capivarí do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar071	Capivarí do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar107	Caçapava do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar109	Caçapava do Sul	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar111	Camaquã	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar132	Camaquã	RS	<i>F. cortaderiae</i>	NIV
12Ar030	Uruguaiana	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar036	Uruguaiana	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar038	Uruguaiana	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar039	Uruguaiana	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar046	Dom Pedrito	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar048	Dom Pedrito	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar049	Dom Pedrito	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON

Continuação APÊNDICE 1. Coleção de isolados pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium graminearum*, obtidos durante as safras de 2008/9, 2010/11 e 2011/12, a partir de sementes e panículas de arroz. Identificadas das espécies e do genótipo tricoteceno por genotipagem de multilocus (MLGT) e por seqüenciamento do gene EF 1- α .

Isolado	Município	Estado	Espécie do complexo Fg	Quimiotipo
12Ar051	Dom Pedrito	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar053	Capivari do Sul	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar059	Capivari do Sul	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar068	Cachoeirinha	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar091	Pelotas	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar092	Brazabrantés	GO	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar095	Pelotas	RS	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Ar010	Dom Pedrito	RS	<i>F. meridionale</i>	NIV