

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

REPRODUÇÃO, PATOGENICIDADE E POTENCIAL TOXIGÊNICO DE  
*Fusarium graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae*

Camila Primieri Nicolli  
Engenheira Agrônoma/UFRGS

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

Porto Alegre (RS), Brasil  
Dezembro de 2014.

**RESERVADA PARA A FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO**

Aos meus pais, Laurindo e Leonida, com todo amor e carinho dedico este  
trabalho, pelo incentivo dado durante toda minha vida.

A minha irmã, Karine pelos momentos de apoio nesta caminhada.

*DEDICO*

## *AGRADECIMENTOS*

Aos meus pais, Leonida Primieri Nicolli e Laurindo Nicolli, e à minha irmã Karine por todo o incentivo e amor.

Ao meu orientador, Professor Emerson Medeiros Del Ponte, por todos os ensinamentos, meu muito obrigada.

À minha coorientadora, Professora Eliana Badiale Furlong pelo auxílio na condução dos trabalhos.

Ao colega Dr. Pierri Spolti, pela troca de ideias e auxílio na condução dos trabalhos.

Aos meus colegas de laboratório, Felipe Dalla Lana, Leilane Silveira, Larissa Gomes e Paulo Kuhnem pelo apoio e bons momentos em grupo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pelos ensinamentos e auxílio na realização do mestrado.

À Universidade Federal de Rio Grande e à Universidade Federal de Viçosa por contribuírem para a realização dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiar e viabilizar o meu mestrado.

“A sabedoria dos homens é proporcional não à sua experiência, mas à sua capacidade de adquirir experiência” (George Bernard Shaw).

# REPRODUÇÃO, PATOGENICIDADE E POTENCIAL TOXIGÊNICO DE *Fusarium graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae*<sup>1</sup>

Autor: Camila Primieri Nicolli  
Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte  
Coorientadora: Eliana Badiale Furlong

## RESUMO

A giberela do trigo na região sul do Brasil é causada por várias espécies do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC, *F. graminearum* species complex). Dentre essas, destacam-se em prevalência, nessa ordem, *Fusarium graminearum* sensu stricto (Fgra), *F. meridionale* (Fmer) e *F. cortaderiae* (Fcor). Baseado na hipótese de que Fgra apresenta vantagens adaptativas em relação às demais, objetivou-se comparar essas espécies quanto a fecundidade (reprodução assexuada), fertilidade (reprodução sexuada, patogenicidade e produção de tricotecenos). Para isso, foi selecionado um total de 33 isolados de três espécies, sendo 12 *F. graminearum*, 11 *F. meridionale* e 10 *F. cortaderiae*, identificados em estudos anteriores. Experimentos foram conduzidos para avaliar: crescimento micelial em duas temperaturas; esporulação e germinação de macroconídios; formação e produção de peritécios em grãos de arroz, trigo e milho; a agressividade na cultivar BRS Guamirim e produção dos tricotecenos deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) e duas formas acetiladas de DON (3-ADON e 15-ADON). Quanto ao crescimento micelial, houve interação significativa entre espécie e temperatura. Isolados Fgra mostraram maior resposta no crescimento ao incremento da temperatura, assim como Fmer em relação à Fcor. Na formação e produção de peritécios nos grãos, um índice de fertilidade relativa (IFR), calculado com base na frequência de formação de peritécios em diferentes níveis de colonização dos grãos, foi maior para todos os isolados quando inoculados em grãos de arroz e milho, comparado com trigo. Independente do substrato, Fgra foi a espécie com o maior IFR seguido de Fmer e Fcor. Fgra apresentou maior percentual de germinação e um maior número de esporos viáveis em relação à média de Fmer + Fcor. No ensaio de patogenicidade, a severidade média da doença foi de 36% e não foi observada diferença estatística entre as espécies. Na análise de micotoxinas produzidas *in vitro*, foram detectadas apenas as duas formas acetiladas de deoxinivalenol e nivalenol, sendo a produção total maior em substrato de arroz. De forma coerente Fgra produziu mais 15-ADON que Fmer e Fcor, da mesma forma que Fmer e Fcor produziram mais nivalenol. Assim, Fgra apresentou evidências de maior vantagem adaptativa em relação às demais espécies.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (56 p.) Dezembro, 2014.

# REPRODUCTION, PATHOGENICITY AND TOXIGENICITY OF *Fusarium graminearum*, *F. meridionale* and *F. cortaderiae*<sup>1</sup>

Author: Camila Primieri Nicolli  
Advisor: Emerson Medeiros Del Ponte  
Coadvisor: Eliana Badiale Furlong

## ABSTRACT

*Fusarium* head blight (FHB) of wheat in southern Brazil is caused by several species of the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC, *F. graminearum* species complex). The most prevalent species include *Fusarium graminearum* sensu stricto (Fgra), *F. meridionale* (Fmer) and *F. cortaderiae* (Fcor), in this order. Based on the hypothesis that Fgra is more fit than the others, this study aimed to compare these species with regards to fecundity (asexual reproduction), fertility (sexual reproduction), pathogenicity and *in vitro* production of trichothecene mycotoxins. For this purpose, 33 isolates of these species were selected, being 12 of *F. graminearum*, 11 of *F. meridionale* and 10 of *F. cortaderiae*, identified in previous studies. Experiments were conducted to assess: mycelial growth rate at two temperatures; sporulation and germination of macroconidia; perithecia formation and trichothecene production in rice, wheat and maize grain substrate; and aggressiveness towards a moderately resistant cultivar (BRS Guamirim) and production of deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and two DON acetylates (3-ADON and 15-ADON). Fgra isolates were more responsive in mycelial growth to the increase of temperature, as was Fmer related to Fcor. Higher relative fertility index (RFI), estimated based on the frequency of different levels of perithecia covering grains, was found for all isolates inoculated on corn and rice grains, rather than wheat grains. Regardless of the substrate, Fgra was the species with the highest IFR followed by Fmer and Fcor. Fgra showed higher percent of macroconidia germination and a greater number of viable spores than the average of Fmer + Fcor. In the pathogenicity test, the average severity of the disease was 36% and there was no significant effect of species. As to mycotoxin analysis, only the two acetylated forms of DON and nivalenol, were detected, with higher total production in the rice substrate. Fgra consistently produced more 15-ADON than Fmer and Fcor, which produced more nivalenol. Therefore, there is evidence that Fgra possess adaptive advantages over the other species.

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (56 p.) December, 2014.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Importância da giberela do trigo.....	5
2.2 Sintomatologia.....	6
2.3 Etiologia.....	6
2.4 Ciclo da doença.....	7
2.5 Epidemiologia.....	10
2.6 Distribuição de espécies e genótipos tricotecenos.....	11
2.7 Reprodução e patogênese do FGSC.....	14
2.8 Características toxigênicas de FGSC.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Coleção de isolados.....	19
3.2 Crescimento micelial em duas temperaturas em meio de cultura.....	22
3.3 Formação de peritécios em grãos.....	22
3.4 Esporulação, germinação e viabilidade de macroconídios.....	24
3.5 Agressividade em espigas de trigo.....	25
3.6 Produção de tricotecenos in vitro em grãos.....	26
3.6.1 Extração e quantificação de tricotecenos.....	26
3.7 Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Resultados.....	29
4.1.1 Crescimento micelial em duas temperaturas em meio de cultura	29
4.1.2 Formação e produção de peritécios em grãos.....	31
4.1.3 Esporulação, germinação e viabilidade de macroconídios.....	33
4.1.4 Agressividade em espigas de trigo.....	36
4.1.5 Produção de tricotecenos in vitro em grãos.....	37
4.2 Discussão.....	40
5. CONCLUSÕES .....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Informações sobre os isolados do FGSC utilizados no estudo.....	20
2. Identificação dos isolados utilizados em cada um dos experimentos.....	21
3. Análise de variância da taxa de crescimento micelial de espécies do complexo <i>Fusarium graminearum</i> (FGSC) em meio de cultura, incubado nas temperaturas de 15 °C e 30 °C, em escuro contínuo.....	29
4. Crescimento micelial médio e intervalo de confiança de 95% de espécies do complexo <i>Fusarium graminearum</i> incubadas em BDA em diferentes temperaturas. A variação ( $\Delta$ ) na taxa de crescimento indica a sensibilidade à temperatura das espécies.....	31
5. Análise de variância nos dados de índice de fertilidade relativa (produção de peritécio) por três espécies do FGSC em substrato de grãos de arroz, milho e trigo.....	32
6. Índice médio de fertilidade relativa, e respectivo intervalo de confiança de 95 %, obtido com base na frequência e percentual da superfície de grãos de arroz, milho ou trigo coberta com peritécios por isolados de três espécies do FGSC.....	33
7. Número médio e intervalo de confiança 95% de esporos, percentual de germinação e número de esporos viáveis.....	35
8. Severidade média da doença (%) e intervalo de confiança de 95 % pela inoculação de espécies do complexo <i>Fusarium graminearum</i> na cultivar BRS Guamirim.....	37
9. Análise de variância da produção de micotoxina in vivo de espécies do FGSC em substratos de grãos de arroz e trigo.....	38

10. Concentrações médias de tricotecenos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e intervalo de confiança de 95 % produzidos por espécies do FGSC em dois substratos inertes (arroz e trigo). As médias das micotoxinas foram agrupadas indiferente ao substrato, pois não foi observada interação significativa para tais tricotecenos..... 39
11. Concentração média total de tricotecenos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e intervalo de confiança de 95 % produzidos por espécies do FGSC em grãos de arroz ou trigo. Análise realizada considerando a interação entre as espécies e o substrato para a concentração total de tricotecenos..... 40

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Filogenia de espécies de <i>Fusarium</i> produtoras de tricotecenos e estruturação das espécies filogenéticas do complexo de espécies <i>Fusarium graminearum</i> através da identificação biogeográfica (FGSC, <i>Fusarium graminearum</i> species complex). Adaptado de Aoki <i>et al.</i> (2012)	8
2. Escala intervalar para percentual de cobertura dos grãos de arroz (A), trigo (B) e milho (C) com peritécios a partir da inoculação com discos de micélio: 0 (sem peritécios); 1 (1 a 10%); 2 (>10 a 30%); e 3 (>30%).....	23
3. Taxa de crescimento micelial de <i>F. graminearum</i> (Fgra; n = 5), <i>F. meridionale</i> (Fmer; n = 7) e <i>F. cortaderiae</i> (Fcor; n = 6) incubados nas temperaturas de 15 °C e 30 °C. Círculos abertos representam a média de três repetições para cada isolado. Pontos pretos representam a média da taxa de crescimento de todos os isolados para cada uma das espécies em cada temperatura. A linha contínua indica a sensibilidade à temperatura pela variação na taxa de crescimento micelial com a variação na temperatura.....	30
4. Distribuição, em ordem do menor ao maior, do índice de fertilidade relativa com base na frequência e quantidade de peritécios produzidos em grãos, para 23 isolados de três espécies do FGSC ( <i>F. graminearum</i> = Fgra, <i>F. meridionale</i> = Fmer e <i>F. cortaderiae</i> = Fcor, inoculados em substrato de arroz (A), milho (B) e trigo (C).....	32
5. Distribuição dos valores de esporulação (A), germinação de macroconídios (B) e o número de esporos viáveis (C) para oito isolados de <i>F. graminearum</i> (Fgra), nove isolados <i>F. meridionale</i> (Fmer) e dez isolados de <i>F. cortaderiae</i> (Fcor). Os círculos representam cada um dos isolados em cada uma das espécies.....	34
6. Severidade média de giberela na cultivar BRS Guamirim inoculada com 17 isolados do complexo <i>Fusarium graminearum</i> pertencentes a três espécies filogenéticas, sendo seis, cinco e seis isolados de <i>F. graminearum</i> , <i>F. meridionale</i> e <i>F. cortaderiae</i> foram utilizados para caracterizar as respectivas espécies (Fgra, Fmer e Fcor) .....	36

7. Concentração de tricotecenos de 30 isolados do FGSC pertencentes a três espécies filogenéticas, sendo dez, dez e dez isolados de *F. graminearum* (Fgra), *F. meridionale* (Fmer) e *F. cortaderiae* (Fcor) foram utilizados para caracterizar as respectivas espécies nos substratos de arroz (A) e trigo (B)..... 38

## 1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo em uma área estimada em 217 milhões de hectares plantados anualmente; cerca de 135 milhões de toneladas foram comercializadas na safra 2012/2013 (FAOSTAT, 2012). Aproximadamente 30% da população mundial têm a sua alimentação baseada em trigo e seus derivados como fonte primária de energia, sendo considerada a segunda fonte de caloria nos países mais populosos como China e Índia (FAO, 2011).

No Brasil, o trigo é cultivado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, com uma produção que oscila entre cinco e seis milhões de toneladas, sendo a região Sul do país responsável por 92% do total produzido (CONAB, 2013). No entanto, para atender a demanda de consumo no Brasil, estimada em torno de 10 milhões de toneladas, ainda é necessário importar quase a mesma quantidade produzida no país (Abitrigo, 2013).

Dentre os fatores bióticos que limitam a produtividade e/ou depreciam a qualidade do trigo, destacam-se as doenças que causam danos e perdas significativas aos produtores, dentre essas, a giberela (McMullen *et al.*, 2012). Causada por membros do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum* species complex, FGSC), reduz o rendimento e contamina os grãos com micotoxinas de implicações toxicológicas em humanos e animais (McMullen *et al.*, 2012). Em determinadas situações, a presença de micotoxinas pode desvalorizar o grão junto ao

mercado, causando prejuízo econômico aos produtores. Dentre as micotoxinas mais importantes destacam-se a deoxinivalenol (DON), da classe dos tricotecenos do tipo B (Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011).

No Brasil, as espécies mais frequentes do FGSC, especialmente no Estado do Rio Grande do Sul, são: *F. graminearum* (Fgra), *F. meridionale* (Fmer) e *F. cortaderiae* (Fcor). Em menores frequências são encontradas as espécies *F. austroamericanum* (Faus) e *F. asiaticum* (Fasi) (Del Ponte *et al.*, 2014). Essas espécies também têm sido identificadas quanto ao genótipo tricoteceno com base na detecção de porções de genes da síntese dos tricotecenos em reação em cadeia de polimerase. De maneira consistente, a análise molecular em isolados de coleções de trigo, cevada e arroz mostraram que *F. graminearum* é do genótipo 15-acetildeoxinivalenol (ADON); *F. meridionale* é do genótipo nivalenol (NIV) e *F. cortaderiae* segrega tanto para NIV como para 3-ADON (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2012; Del Ponte *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2015).

Na América do Norte e Europa *F. graminearum* é também dominante dentre as espécies do complexo, no entanto, segrega para os três genótipos supracitados (Tóth *et al.*, 2005; Somma *et al.*, 2014). Apesar dos genótipos tricotecenos serem considerados preditivos do quimiotipo, estudos têm mostrado discrepâncias entre a genotipagem e a quimiotipagem (análise química do substrato de crescimento do fungo), já que alguns isolados com um determinado genótipo tricoteceno podem produzir primariamente outro tricoteceno e não aquele predito pelo método molecular (Sampietro *et al.*, 2012).

A preocupação com a segurança alimentar, devido à frequência de micotoxinas em grãos e alimentos produzidos com cereais, tem levado vários países a promulgar limites máximos de tolerância (LMT) de micotoxinas em cereais. Na Europa, o LMT de micotoxinas é regulado desde 2007 (CE Nº 1881/2006). Mas, até o momento não há legislação prevendo LMT para NIV em alimentos ou rações (Leatherhead Food

Research, 2010), uma vez que estudos da European Food Safety Authority (EFSA) ainda não observaram risco à saúde humana associada à NIV.

No Brasil, a regulamentação iniciou em 2012, incluindo o trigo e seus subprodutos (ANVISA, 2011). Dentre as micotoxinas regulamentadas estão incluídos DON e zearalenona (ZEA), ambas produzidas por algumas espécies de *Fusarium*, especialmente aquelas do FGSC. O Brasil também não tem LMT para nivalenol, embora o LMT e a concentração de NIV em cereais podem variar entre os locais amostrados (Del Ponte *et al.*, 2012). Assim, a caracterização do potencial toxigênico das populações das espécies filogenéticas é essencial para análises de risco e embasamento para os ajustes na legislação, uma vez que outras micotoxinas podem estar sendo produzidas associadas à giberela do trigo no Brasil (Del Ponte *et al.*, 2014).

O predomínio de certos genótipos tricotecenos em populações patogênicas tem sido associado a vantagens competitivas supostamente associadas ao perfil toxigênico das espécies, o que poderia levar a mudanças no perfil populacional do patógeno, conforme determinado em algumas regiões que comparam coleções antigas com coleções contemporâneas de isolados (Purahong *et al.*, 2014).

No Brasil, foi demonstrado que isolados de Fgra com genótipo 15-ADON apresentaram maior agressividade que isolados Fmer do genótipo NIV, resultado observado em cultivar moderadamente resistente, mas não em cultivar suscetível (Spolti *et al.*, 2012). Estudos sobre a biologia de populações de espécies de FGSC são escassos e evidências sobre vantagens competitivas de determinadas espécies têm sido contraditórias (Spolti & Del Ponte, 2013) e ainda precisam ser mais exploradas, especialmente com um maior número de isolados.

A hipótese do presente estudo é que as espécies dominantes na cultura do trigo apresentam vantagem adaptativa em relação àquelas presentes em menor frequência. A

adaptabilidade dessas espécies pode estar relacionada às características da fase saprofítica do ciclo de vida do fungo como também vantagem competitiva na fase patogênica ou mesmo toxigênica. No Brasil, embora a genotipagem dos tricotecenos seja uma técnica amplamente utilizada, ainda se desconhece o quimiotipo das espécies presentes na cultura do trigo, bem como os fatores que influenciam na produção da toxina *in vivo*, tal como em substrato.

Assim, utilizando uma coleção de isolados representativos de três espécies do FGSC presentes no Sul do Brasil, este estudo objetivou comparar essas espécies quanto a i) fecundidade ou fertilidade nas fases sexuada e assexuada do ciclo de vida do patógeno; ii) agressividade em cultivar com nível moderado de resistência genética; iii) produção de tricotecenos em condições de crescimento *in vitro* em dois substratos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância da giberela do trigo

A giberela é uma das mais importantes doenças da cultura do trigo devido aos danos potenciais no rendimento e na qualidade dos grãos (McMullen *et al.*, 2012). A doença é de grande importância no Brasil e no mundo, devido à ocorrência mais frequente de epidemias a partir da década de 1990, coincidentes com condições climáticas favoráveis à doença, quando comparada às décadas anteriores (Del Ponte *et al.*, 2009). Além do clima, a doença tem sido atribuída a mudanças nas práticas culturais, especialmente com a ampla adoção do plantio direto, que contribuiu para a manutenção da fonte de inóculo (Reis *et al.*, 2011).

O dano médio estimado em trigo causado por giberela no Sul do Brasil foi de 19% em 21 safras (de 1984 a 1994 e de 1999 a 2010), com o dano máximo de 40% registrado na safra do ano de 2007 (Reis *et al.*, 1996; Panisson *et al.*, 2003; Casa *et al.*, 2004; Reis & Carmona, 2013).

O aumento da importância da doença tem causado preocupação da cadeia produtiva do trigo, especialmente devido à presença de micotoxinas nocivas à saúde de humanos e animais. De forma a garantir a segurança alimentar, alguns países têm implementado medidas regulatórias para LMT de algumas micotoxinas em grãos e subprodutos para consumo humano e animal (Brennan *et al.*, 2007), inclusive o Brasil (Anvisa, 2011).

## 2.2 Sintomatologia

Os primeiros sintomas de giberela em trigo podem ser observados de quatro a seis dias após a infecção (Parry *et al.*, 1995). A infecção do fungo ocorre no período do florescimento do trigo e o sítio de infecção é através das anteras. A colonização ocorre através da ráquis que é responsável pela expansão da doença na espiga do trigo (Brown *et al.*, 2010). O fungo também pode infectar o pedúnculo logo abaixo da espiga, causando lesões necróticas marrom-avermelhada no tecido (Del Ponte *et al.*, 2004). Eventualmente massas de esporos rosa-alaranjadas do fungo (esporodóquios), podem ser vistos nas espiguetas atacadas e glumas caso expostas ao clima úmido por tempo prolongado.

Os grãos infectados por *F. graminearum* são deformados, chochos e esbranquiçados (Sutton *et al.*, 1982; Del Ponte *et al.*, 2007). No entanto, o grau de intensidade dos sintomas nos grãos depende do momento das infecções (Del Ponte *et al.*, 2007; Cowger & Arrelano, 2010). Em infecções tardias, ou seja, durante o enchimento de grãos, as alterações no tamanho e peso de grãos são menores e, portanto o peso dos grãos infectados assemelha-se ao peso de grãos saudáveis, mas ainda assim, podem se apresentar contaminados com micotoxinas (Del Ponte *et al.*, 2007; Cowger & Arellano, 2010).

## 2.3 Etiologia

A giberela em trigo é causada principalmente pela morfoespécie *Fusarium graminearum* Schwabe - teleomorfo: *Gibberella zeae* (Schwein). Nos países europeus e regiões de clima temperado, *F. culmorum*, *F. poae* e *F. avenaceum* são espécies também encontradas associadas à giberela em trigo (Tóth *et al.*, 2005; McMullen *et al.*, 2012).

Em um estudo filogenético com isolados de várias regiões do mundo, foram determinadas sete linhagens de *F. graminearum* estruturadas biogeograficamente (O'Donnel *et al.*, 2000). Posteriormente, as sete linhagens foram definidas como espécies filogenéticas com concordância genealógica, junto com mais duas novas espécies, compondo o complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC, *Fusarium graminearum* species complex) (O'Donnel *et al.*, 2004). Desde então o número de espécies foi ampliado até um total atual de 16 espécies do FGSC, e dessas, 15 espécies foram formalmente nomeadas, denominadas: *Fusarium acacia-mearnsii*, *F. aethiopicum*, *F. asiaticum*, *F. austroamericanum*, *F. boothii*, *F. brasiliicum*, *F. cortaderiae*, *F. gerlachii*, *F. graminearum* sensu stricto, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, *F. ussurianum*, *F. vorosii*, *F. nepalense* e *F. lousianense*. (O'Donnel *et al.*, 2000; O'Donnel *et al.*, 2004; O'Donnel *et al.*, 2008; Sarver *et al.*, 2011; Aoki *et al.*, 2012) (Figura 1).

Embora se afirme que seis espécies do complexo possam ser separadas por características morfológicas dos conídios, a identificação dessas espécies só é possível de maneira acurada por métodos moleculares, especialmente com base em sequências de mais de um gene (Aoki *et al.*, 2012).

#### **2.4 Ciclo da doença**

O patógeno sobrevive como saprófita nos restos culturais de cereais como milho, cevada, aveia e centeio (McMullen *et al.*, 1997). O fungo possui também uma ampla gama de hospedeiros secundários que podem contribuir para a manutenção do inóculo (Landschoot *et al.*, 2011). Dentre eles, as gramíneas, incluindo espécies dos gêneros *Agropyron*, *Agrostis*, *Andropogon*, *Botriochloa*, *Bromus*, *Cenchrus*, *Cortaderia*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Lolium*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Poa* e *Setaria* (Pereyra & Dill-Macky, 2004).

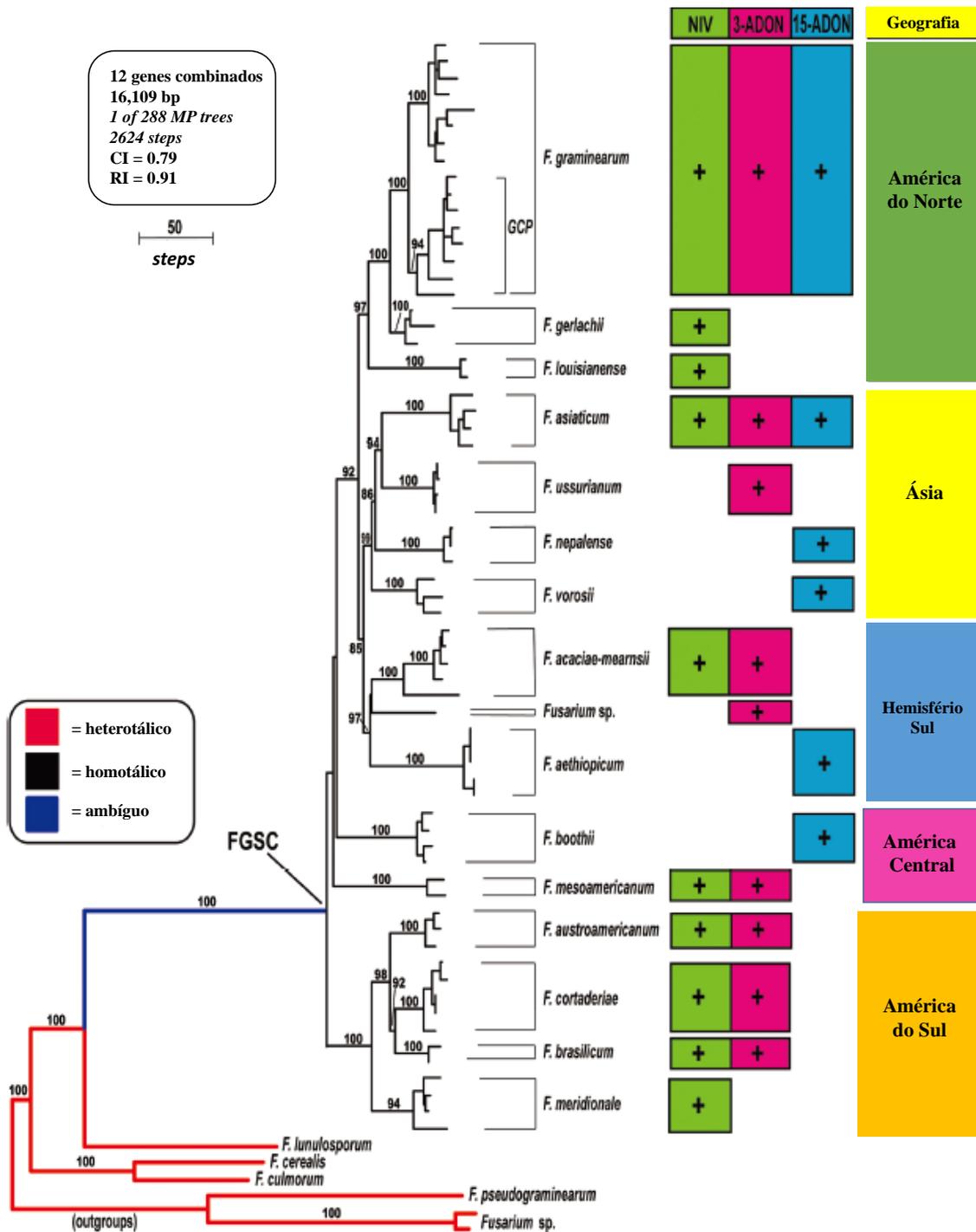


FIGURA 1. Filogenia de espécies de *Fusarium* produtoras de tricotecenos e estruturação das espécies filogenéticas do complexo de espécies *Fusarium graminearum* através da identificação biogeográfica (FGSC, *Fusarium graminearum* species complex). Adaptado de Aoki *et al.* (2012).

Nos restos culturais ou nos hospedeiros secundários, sob condições ótimas de molhamento, ocorre o desenvolvimento da fase sexual, pela formação de hifas dicarióticas (binucleadas) capazes de formar corpos de frutificação conhecidos como peritécios (Reis, 1990; Leplat *et al.*, 2013). Temperaturas entre 5 °C a 35 °C favorecem a formação de peritécios, sendo 29 °C a temperatura ótima (Sutton, 1982).

A produção dos ascósporos ocorre na faixa de 13 °C a 33 °C, com temperatura ótima de 25 °C a 28 °C. O fotoperíodo é um fator ambiental que altera a taxa de liberação dos ascósporos, sendo maior na presença da luz (Trail *et al.*, 2002). Após liberados, os ascósporos são carregados pela ação do vento através da turbulência atmosférica e podem alcançar longas distâncias da fonte de origem (Hallen & Trail, 2008). A maior deposição dos ascósporos ocorre durante a noite, possivelmente como resultado da inversão da turbulência atmosférica no período noturno (Del Ponte *et al.*, 2005; Prussin, 2013).

O período de suscetibilidade do trigo às infecções por *F. graminearum* se estende do início da floração até estádios de grão em massa mole em cultivar suscetível (Del Ponte *et al.*, 2007). No entanto, a giberela é considerada uma doença monocíclica devido especialmente o curto período de suscetibilidade (Sutton, 1982). A infecção ocorre pela deposição dos esporos (conídios e ascósporos) nas espiguetas, os quais germinam e entram na planta através de aberturas naturais na base da lema e da pálea, ou pelos tecidos degenerados da antera (Pritsch *et al.*, 2000).

No início da infecção, ainda sem sintomas visíveis, ocorre a colonização dos espaços extracelulares (Brown *et al.*, 2010). Estudos moleculares mostraram, nessa fase, uma alta expressão dos genes *Tri* (*Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri9*, e *Tri14*), relacionados à síntese das micotoxinas da classe dos tricotecenos (Brown *et al.*, 2011). Quando produzidas no

tecido do hospedeiro essas micotoxinas inibem a síntese protéica, suprimindo a defesa da planta (Jansen *et al.*, 2005).

Posteriormente, o fungo cresce intercelularmente (Jansen *et al.*, 2005), radialmente, necrosando o tecido colonizado e expressando o sintoma típico da doença, pela descoloração das espiguetas infectadas e a deformação das aristas (McMullen *et al.*, 1997). A taxa de colonização da espiga via ráquis é dependente do nível de resistência da cultivar e da temperatura (Parry *et al.*, 1995), e há uma tendência da colonização progredir na direção basipetal em detrimento ao movimento acropetal (Malbrán *et al.*, 2014). Além disso, pode ocorrer a senescência das espigas pela fitotoxidez das toxinas produzidas durante o processo de infecção e colonização (Brown *et al.*, 2011).

## **2.5 Epidemiologia**

A giberela é favorecida em ambientes com chuvas prolongadas, alta umidade relativa do ar e clima quente no período da floração do trigo e desenvolvimento dos grãos na espiga (Goswami & Kistler, 2004). A principal fonte do inóculo primário da doença são os restos culturais (Sutton, 1982; Xu *et al.*, 2004; Leplat *et al.*, 2013). O inóculo principal é constituído de ascósporos (esporos sexuais) produzidos em peritécios sobre os restos de culturas que antecedem o plantio do trigo, mas especialmente o milho, onde causa a podridão em colmos (Sutton, 1982; Trail, 2009). A ejeção dos ascósporos do interior dos peritécios ocorre por efeito de molhamento (Trail *et al.*, 2002). Dependendo das condições atmosféricas, os esporos podem alcançar longas distâncias (Schmale *et al.*, 2006).

As cultivares comerciais de trigo são suscetíveis à doença em diferentes níveis e a infecção inicia durante a floração, podendo ocorrer nas fases de enchimento dos grãos (Del Ponte *et al.*, 2007; Cowger & Arrellano, 2010). O inóculo, em regiões onde se

utiliza práticas conservacionistas, como o plantio direto, pode ser encontrado em todos os meses do ano (Casa *et al.*, 2004). Estudos de modelagem sugeriram o aumento na ocorrência da giberela no Sul do Brasil em função da maior frequência de anos favoráveis à doença, como chuvas mais frequentes no período da primavera (Del Ponte *et al.*, 2009).

O sucesso do manejo da doença depende do conhecimento dos fatores epidemiológicos. Dentre esses, é importante conhecer a população do patógeno presente em uma região para entender sobre a adaptabilidade do patógeno às cultivares e às práticas culturais utilizadas. Assim como, as mudanças na sensibilidade aos fungicidas utilizados para o controle da giberela; o fluxo gênico entre as populações; o perfil e potencial toxigênico das populações e o risco de dispersão de variantes genótípicas que sejam mais agressivas ou toxigênicas entre lavouras e regiões (Gale *et al.*, 2002).

## **2.6 Distribuição de espécies e genótipos tricotecenos**

Recentemente, diversos estudos de identificação FGSC foram conduzidos na região sul do Brasil (nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná) por meio da coleta de isolados do patógeno associado a espigas sintomáticas no campo ou grãos colhidos em lavouras comerciais (Astolfi *et al.*, 2012, Del Ponte *et al.*, 2014). Seis espécies de FGSC já foram identificadas associadas a diferentes hospedeiros no Brasil, sendo: Fgra, Fmer, Fcor, Faus e Fasi (Astolfi *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2014).

A quimiotaxonomia para *Fusarium 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).

Os genótipos tricotecenos associados às espécies filogenéticas presentes no Brasil apresentam-se relativamente estruturados nas espécies, sendo 15-ADON para todos os isolados Fgra e NIV para os isolados Fmer e Fasi. Já Fcor e Faus apresentaram os dois genótipos (Del Ponte *et al.*, 2014).

No sul do Brasil um estudo, com amostras de 82 isolados de Fgra obtidos de amostras de grãos de trigo sintomáticos da região sul do país, demonstrou a predominância de isolados 15-ADON, não sendo detectado o tipo 3-ADON (Scoz *et al.*, 2009). Isolados NIV foram detectados em seis indivíduos obtidos de amostras de distintos locais, distribuídos de maneira aleatória e em co-ocorrência com o tipo 15-ADON na mesma amostra (Scoz *et al.*, 2009). Em trigo (Scoz *et al.*, 2009) e cevada (Astolfi *et al.*, 2011), a frequência de Fgra foi de 92% e 66%, respectivamente

Em outro estudo, Astolfi *et al.* (2012) amostraram três campos de trigo no Rio Grande do Sul. Destas três populações, um total de 140 isolados do FGSC foram analisados quanto à frequência do genótipo tricoteceno. A diversidade genética foi avaliada em uma amostra de 103 isolados de Fgra, sendo que o genótipo 15-ADON foi dominante, seguido pelo genótipo NIV nas três populações amostradas. Ainda, todos os isolados do genótipo NIV foram identificados como Fmer e todos os isolados do genótipo 15-ADON como Fgra (Astolfi *et al.*, 2012). No Sul do Brasil, a espécie Fgra predomina (90%) seguida por Fmer (10%) (Astolfi *et al.*, 2012).

A frequência dessas espécies filogenéticas na região sul do Brasil parece estar fortemente relacionada com o hospedeiro de origem e a região geográfica (Del Ponte *et al.*, 2014). No estado do Paraná, a frequência relativa de Fmer (> 28%) em trigo é maior

que quando comparada com a sua frequência no estado do Rio Grande do Sul ( $\leq 9\%$ ) (Del Ponte *et al.*, 2014). Em estudos com inoculações dessas duas espécies em espigas de trigo (Spolti *et al.*, 2012) e em plântulas de milho (Kuhnem *et al.*, 2013), foi observado que Fgra foi mais agressiva em trigo e que Fmer foi mais agressiva em milho.

Estudos de identificação de espécies e genótipo tricoteceno do FGSC também têm sido feito em outros países. Na Europa, os genótipos DON e NIV estão presentes em diversos países, entre eles, na Alemanha (Muthomi *et al.*, 2000), Itália (Gang *et al.*, 1998), Noruega (Langseth *et al.*, 1999) e França (Bakan *et al.*, 2001). O genótipo DON predomina na porção central da Europa, predominando a forma acetilada 15-ADON (Tóth *et al.*, 2005). Em contraste, na porção norte foi observado exclusivamente genótipo 3-ADON (Langseth *et al.*, 1999). No continente Europeu, a espécie Fgra é a prevalente, além de relatos de ocorrência de Fmer, Fcor e Fboo (Somma *et al.*, 2014).

Na Ásia, Fasi é a espécie prevalente no Japão (Suga *et al.*, 2008) e na China (Qu *et al.*, 2008), com a co-ocorrência de Fgra ou mesmo a dominância de Fgra em algumas regiões (Wang *et al.*, 2011). Além das duas espécies citadas, também foram relatadas as espécies Fmer, Fboo e Fnep no continente asiático (Wang *et al.*, 2011).

Na América do Sul, na Argentina, o quimiotipo DON é dominante, com alguns representantes produzindo 3-ADON, não sendo encontrados os tipos 15-ADON e NIV por meio de análises químicas (Ramirez *et al.*, 2006). Nesse país, são frequentemente encontradas outras espécies como Fmer, Fboo (Sampietro *et al.*, 2012), Fasi, Fbra, Fcor e Faus (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013), além de Fgra, potencialmente produtoras de tricotecenos e outras toxinas, possivelmente relacionado com as diferentes condições climáticas, como o clima temperado (Lori *et al.*, 2003). Entretanto, foi detectado pela

primeira vez em amostras de trigo afetadas por giberela em 2001 e 2002, o quimiotipo NIV (Pinto *et al.*, 2008).

No Uruguai, foram encontradas, além de Fgra, as espécies Fasi, Fbra, Fcor e Faus (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013). Os autores observaram diferenças regionais na composição de espécies e tipos tricotecenos do FGSC nas regiões produtoras do Uruguai. Isolados de Fgra (15-ADON) foram os mais prevalentes nas províncias ocidentais e Fasi e o quimiotipo NIV foi predominante na zona de produção de Cerro Largo ao longo da fronteira oriental do Uruguai com o Brasil. A predominância de NIV na região oriental do Uruguai é uma preocupação na segurança alimentar e no monitoramento de níveis de nivalenol (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013).

Em resumo, os genótipos DON (e suas formas acetiladas) e NIV têm sido encontrados em todas as regiões amostradas. Na América do Norte (Schmale *et al.*, 2011), América do Sul (Pan *et al.*, 2013) e Europa (Nielsen *et al.*, 2012). O genótipo tricoteceno predominante é DON e 15-ADON, enquanto que NIV é o genótipo tricoteceno predominante na Ásia (Wang *et al.*, 2011).

## **2.7 Reprodução e patogênese do FGSC**

Estudos têm sugerido que a frequência das espécies do complexo está relacionada às características da habilidade saprofítica e patogênica condicionadas ao substrato ou hospedeiro (Eudes *et al.*, 2001; Gale *et al.*, 2009; Puri & Zhong, 2010; Von der Ohe *et al.*, 2010). Em um estudo conduzido por Lee e colaboradores na Coreia do Sul (Lee *et al.* 2009), de uma coleção de isolados do complexo FGSC recuperados de entrenós de plantas de arroz previamente inoculadas com duas espécies, os autores observaram uma maior frequência (87%) de Fasi do que Fgra (14%), sugerindo que a

maior frequência de Fasi no arroz estaria relacionado a vantagens adaptativas ligadas à fase saprofítica.

Diferenças relacionadas ao perfil toxigênico dos isolados, especificamente quanto ao genótipo tricoteceno, também têm sido consideradas como fatores de influência na dinâmica das populações. Há relatos de alterações no perfil toxigênico de populações de Fgra no estado americano de Minnesota (Burlakotti *et al.*, 2011) e no leste do Canadá (Ward *et al.*, 2008), onde a população predominante 15-ADON vem sendo substituída por indivíduos 3-ADON.

Na Ásia, populações com predomínio de isolados 15-ADON e NIV também vêm sendo substituídas por populações com genótipo predominante 3-ADON (Wang *et al.*, 2011). A maior agressividade dos isolados 3-ADON poderia estar relacionada a essas mudanças populacionais por representar uma vantagem patogênica em comparação aos isolados 15-ADON (Von der Ohe *et al.*, 2010). Ward *et al.* (2008) e Puri & Zhong (2010) mostraram que isolados 3-ADON foram mais agressivos e produziram maior quantidade da micotoxina DON em plantas de trigo que isolados 15-ADON.

No entanto, Gale *et al.* (2009) pela inoculação no campo de isolados da população antecedente (15-ADON) não observaram diferença quando comparados a isolados da população emergente (3-ADON), nos Estados Unidos. Da mesma forma, Spolti *et al.* (2014) avaliando características associadas à adaptação saprofítica e patogênica de 50 isolados de Fgra de uma população contemporânea do estado americano de Nova York não observaram diferença entre isolados 15-ADON e 3-ADON.

Estudos relacionados à agressividade e a reprodução das espécies do FGSC seja a fase assexuada (germinação, crescimento micelial e esporulação) ou a fase sexual (formação de peritécio e de ascósporos), são incipientes (Spolti *et al.*, 2012, Spolti &

Del Ponte, 2013; Spolti *et al.*, 2014). Tais estudos objetivam identificar os fatores que podem explicar as alterações no perfil populacional (Qu *et al.*, 2008).

Há indícios também de diferenças de fertilidade na fase sexual entre as espécies do complexo, que poderiam favorecer o domínio da espécie com maior fertilidade. Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2012), examinaram 568 isolados sul-coreanos do FGSC coletados a partir de grãos de milho. Utilizando polimorfismo dos fragmentos amplificados (AFLPs), 75% dos isolados foram identificados como Fgra, seguido de Fasi (12%), Fboo (12%) e Fmer (1%). Todos os isolados Fgra foram férteis (formaram peritécios), enquanto que isolados Fasi, Fboo e Fmer apresentaram fertilidade de 70%, 26% e 14%, respectivamente. As espécies Fboo e Fgra produziram deoxinivalenol, enquanto Fmer e Fasi produziram nivalenol (Lee *et al.*, 2012).

Spolti *et al.* (2012) avaliaram a taxa de crescimento micelial, esporulação, taxa de germinação (indicadores de reprodução assexual) e agressividade de dois pares de isolados, provindos de trigo e cevada, pertencentes a Fgra e Fmer. Todas as variáveis examinadas, exceto a taxa de germinação, diferiram significativamente entre as duas espécies, sendo isolados de Fgra, os que apresentaram as maiores taxas de crescimento micelial e esporulação. Em relação à agressividade, os isolados de Fgra também apresentaram maior capacidade de infecção e colonização, resultado observado em cultivar menos suscetível (BRS Guamirim) e não na cultivar suscetível (BRS 194). Os autores discutiram que essas diferenças podem explicar a maior predominância de Fgra no trigo, como observado anteriormente (Astolfi *et al.*, 2012).

Spolti & Del Ponte (2013) avaliaram características fenotípicas de um conjunto de 19 isolados de duas espécies do complexo (dez isolados Fgra e nove isolados Fmer). Utilizando inoculação por aspersão e análise multivariada dos dados, não foi possível

discriminar as espécies filogenéticas. No entanto, as médias de esporulação total e taxa de germinação foram mais altas para os isolados Fgra ( $P \leq 0,016$ ).

Panthi *et al.* (2014) avaliaram oito isolados de Fgra com genótipo tricoteceno 15-ADON quanto à agressividade e à produção de DON em grãos de trigo de uma variedade suscetível. A agressividade foi positiva e linearmente relacionada com a produção de DON em grãos ( $R^2 = 0,98$ ;  $P < 0,0001$ ), os isolados que mais produziram DON também foram os mais agressivos.

Kuhnem *et al.* (2014) realizaram um estudo para avaliar se os isolados americanos de Fgra patogênicos do trigo e do milho eram mais agressivos em seu hospedeiro de origem e se a agressividade era influenciada pelo genótipo tricoteceno. Os isolados inoculados em plântulas milho e espigas de trigo, não apresentaram diferença significativa ( $P = 0,098$ ;  $P = 0,140$ ) quanto à agressividade entre os isolados oriundos do trigo e do milho, assim como não foi observada diferença significativa ( $P = 0,079$ ;  $P = 0,132$ ) entre os genótipos 3-ADON e 15-ADON.

## 2.8 Características toxigênicas de FGSC

A análise da diversidade genética das espécies do complexo *F. graminearum* e o uso de *primers* específicos com alvo em porções de genes preditivos da síntese dos tricotecenos (*Tri3*, *Tri5*, *Tri7*, *Tri12* e *Tri13*) são ferramentas que auxiliam a identificar as espécies filogenéticas e predizer características das espécies, como por exemplo, o potencial toxigênico dos isolados (Ward *et al.*, 2008; Schmale *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2011; De Ponte *et al.*, 2014).

Estudos de distribuição das espécies filogenéticas e dos genótipos tricotecenos são de grande relevância, uma vez que predizem a possível contaminação dos grãos de cereais em níveis considerados perigosos para o consumo humano e de animais (Santin

*et al.*, 2000). No Brasil, as duas espécies filogenéticas de maior frequência, Fgra e Fmer têm sido caracterizadas geneticamente como produtoras dos tricotecenos 15-ADON e NIV, respectivamente (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2012; Del Ponte *et al.*, 2014). Os tricotecenos são classificados em tipo A e em tipo B, neste último grupo estão NIV, DON e suas duas formas acetiladas (3-ADON e 15-ADON) (Santin *et al.*, 2000). Além dos tricotecenos, a micotoxina ZEA também tem sido frequentemente encontrada em grãos de trigo produzidos no Brasil (Furlong *et al.*, 1995).

DON é a micotoxina de maior importância dentre os tricotecenos, com grande número de relatos de ocorrência em trigo e seus derivados, muitas vezes em concentrações elevadas (Puri & Zhong, 2010; Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011). Porém, NIV também pode ser detectado em níveis significantes (Del Ponte *et al.*, 2012). Del Ponte *et al.* (2012) analisaram 66 amostras de grãos de trigo provenientes de lavouras comerciais do Rio Grande do Sul e observaram a ocorrência simultânea das micotoxinas DON e NIV em 59 amostras, com concentração média de DON e NIV igual a 540 µg/kg e 337µg/kg, respectivamente, evidenciando que as populações produzem ambas as micotoxinas.

Mugrabi de Kupler *et al.* (2011) caracterizou geneticamente e quimicamente isolados do FGSC quanto ao potencial de produzir DON e NIV. Revelou discrepâncias com relação ao potencial de produção de micotoxinas, ou seja, isolados de um genótipo tricoteceno foram capazes de produzir micotoxinas de outros quimiotipos em quantidades consideráveis (Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011). No entanto, ainda que inconsistente, o genótipo tricoteceno vem sendo utilizado como informação preditiva do potencial toxigênico das populações do FGSC (Ward *et al.*, 2008; Schmale *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2014).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Coleção de isolados**

Trinta e três isolados foram selecionados de uma coleção obtida de espigas sintomáticas coletadas em lavouras comerciais de trigo entre as safras 2007 e 2011 no estado do Rio Grande do Sul. Os isolados foram identificados em estudos anteriores (Astolfi *et al.*, 2012, Del Ponte *et al.*, 2014). O critério de escolha foi baseado na espécie filogenética, genótipo tricoteceno e na safra coletada, de forma a representar os genótipos mais frequentes (Del Ponte *et al.*, 2014).

Com essa coleção foram conduzidos diversos experimentos para a caracterização da reprodução assexuada e sexual, da agressividade, e do potencial toxigênico dos isolados. Para facilitar a identificação dos isolados em cada uma das espécies, criou-se a nomenclatura código da dissertação (Tabela 1). Na Tabela 2, estão especificados quais isolados foram utilizados em cada experimento realizado.

TABELA 1. Informações sobre os isolados do FGSC utilizados no estudo.

Espécie filogenética <sup>1</sup>	Genótipo Tricoteceno <sup>2</sup>	Código Coleção	Código Dissertação	Safra de origem	Município
<i>F. graminearum</i>	15-ADON	09Tr_006	Fgra1	2009	Panambi
		10Tr_008	Fgra2	2010	Ijuí
		10Tr_042	Fgra3	2010	Tapejara
		11Tr_073	Fgra4	2011	Coxilha
		10Tr_084	Fgra5	2010	Coxilha
		11Tr_032	Fgra6	2011	Cruz Alta
		07Tr_039	Fgra7	2007	Ernestina
		07Tr_132	Fgra8	2007	Ernestina
		09Tr_125	Fgra9	2009	Carazinho
		11Tr_076	Fgra10	2011	- <sup>3</sup>
		11Tr_046	Fgra11	2011	-
		11Tr_073	Fgra12	2011	-
<i>F. meridionale</i>	NIV	09Tr_002	Fmer1	2009	Coxilha
		09Tr_092	Fmer2	2009	S. Bárbara do Sul
		09Tr_109	Fmer3	2009	Ernestina
		10Tr_054	Fmer4	2010	Caseiros
		10Tr_082	Fmer5	2010	Ibiaça
		11Tr_087	Fmer6	2011	-
		10Tr_135	Fmer7	2010	-
		07Tr_205	Fmer8	2007	Nonoai
		07Tr_213	Fmer9	2007	Nonoai
		10Tr_159	Fmer10	2010	Sertão
		11Tr_145	Fmer11	2011	-
<i>F. cortaderiae</i>	NIV	09Tr_011	Fcor1	2009	Panambi
		09Tr_137	Fcor2	2009	Vacaria
		09Tr_143	Fcor3	2009	Vacaria
		10Tr_122	Fcor4	2010	Mato Castelhano
		10Tr_169	Fcor5	2010	Sananduva
		10Tr_175	Fcor6	2010	Barreto
		10Tr_213	Fcor7	2010	Vacaria
		11Tr_048	Fcor8	2011	Coxilha
		11Tr_150	Fcor9	2011	-
		07Tr_133	Fcor10	2007	Ernestina

<sup>1,2</sup>Identificação por multilocus (MLGT-*multilocus genotyping*): genotipagem da espécie filogenética e do genótipo tricoteceno, através de sondas específicas submetidas a extensão de *primers* alelo-específica utilizando a técnica *Luminex* (Ward *et al.*, 2008).

<sup>3</sup>Informação desconhecida.

TABELA 2. Identificação dos isolados utilizados em cada um dos experimentos.

Código	Experimentos								
	CM <sup>1</sup>	Peritécio			EG <sup>5</sup>	Agressividade		Micotoxina	
		M <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	A <sup>4</sup>		GuaI <sup>6</sup>	GuaII <sup>7</sup>	Vitro(T <sup>3</sup> )	Vitro (A <sup>4</sup> )
Fgra1	x				x	x	x	x	x
Fgra2	x				x			x	x
Fgra3	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fgra4	x	x	x	x	x				
Fgra5		x	x	x	x	x	x	x	x
Fgra6		x	x	x	x			x	x
Fgra7		x	x	x	x	x	x	x	x
Fgra8	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fgra9		x	x	x		x	x	x	x
Fgra10		x	x	x				x	x
Fgra11									
Fgra12								x	x
Fmer1		x	x	x	x	x	x	x	x
Fmer2	x				x			x	x
Fmer3	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fmer4	x				x			x	x
Fmer5	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fmer6	x	x	x	x	x			x	x
Fmer7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fmer8	x	x	x	x	x			x	x
Fmer9		x	x	x	x	x	x		
Fmer10		x	x	x					
Fmer11								x	x
Fcor1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fcor2					x	x	x	x	x
Fcor3	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fcor4		x	x	x	x			x	x
Fcor5		x	x	x	x			x	x
Fcor6		x	x	x	x	x	x	x	x
Fcor7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fcor8	x				x			x	x
Fcor9	x				x	x	x	x	x
Fcor10	x	x	x	x	x			x	x

<sup>1</sup>CM = crescimento micelial; <sup>2</sup>M= milho; <sup>3</sup>T= trigo; <sup>4</sup>A= arroz; <sup>5</sup>EG = esporulação e germinação

<sup>6</sup>GuaI = BRS Guamirim experimento I; <sup>7</sup>GuaII = BRS Guamirim experimento II.

### **3.2 Crescimento micelial em duas temperaturas em meio de cultura**

Dezoito isolados foram avaliados, sendo cinco, sete e seis isolados de *F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae*, respectivamente. Os isolados foram cultivados em meio de cultura pronto Batata-Dextrose-Ágar (BDA) por sete dias a 25 °C em escuro contínuo. Dessas culturas, discos de micélio de 0,6 mm foram retirados e individualmente posicionados no centro de placas de Petri (9 cm de diâmetro). No momento de verter o meio de cultura foi utilizada uma pipeta com o intuito de padronizar a quantidade, vertendo 20 mL de meio por placa de Petri. As culturas foram incubadas em duas temperaturas diferentes (15 °C e 30 °C) em escuro contínuo durante cinco dias. O diâmetro da colônia foi medido a partir de duas direções perpendiculares e a taxa média de crescimento radial (cm/dia) foi determinada (Spolti *et al.*, 2012). A sensibilidade à temperatura de cada um dos isolados foi obtida pela razão entre a taxa de crescimento do isolado a 30 °C e a respectiva taxa de crescimento a 15 °C (Zhan & McDonald, 2011; Spolti *et al.*, 2014). Três repetições (placas) foram utilizadas para cada combinação de isolado x temperatura.

### **3.3 Formação de peritécios em grãos**

Vinte e três isolados foram avaliados, sendo oito, oito e sete isolados de *F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae*, respectivamente. A produção de peritécios foi avaliada em três substratos compostos por grãos de arroz (com casca), trigo (cultivar BRS Guamirim) e milho (híbrido UFV 2000), adaptando-se a metodologia utilizada por Chen & Zhou (2009). Os grãos de arroz, milho e trigo (20 g) foram embebidos em 10 mL de água destilada e autoclavados por 20 min a 127 °C uma vez por dia, durante três dias consecutivos, visando à esterilização. Após, os grãos foram colocados em placas de Petri e inoculados com três discos (0,6 mm de diâmetro)

de BDA de colônias de um isolado crescido por sete dias. Após, os grãos inoculados foram mantidos no escuro por 21 dias a 25 °C. Em seguida, foram transferidos para casa de vegetação com temperatura controlada ( $\pm 25$  °C) onde permaneceram por sete dias para a secagem. Posteriormente à secagem, foram acondicionados em caixas *Gerbox* sobre um substrato contendo uma camada de areia esterilizada (2 cm) e três folhas de papel filtro, e mantidos em casa de vegetação. O substrato foi umedecido diariamente com água. Após 21 dias nessas condições, 50 grãos de cada isolado foram selecionados para avaliação da proporção da superfície do grão coberta com peritécios, com base em uma escala diagramática intervalar que foi desenvolvida para esse estudo, com quatro intervalos (Figura 2).

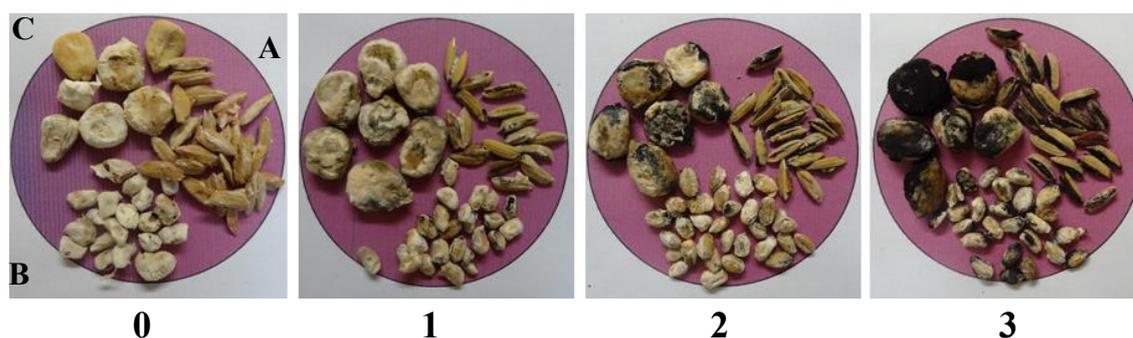


FIGURA 2. Escala diagramática de notas para intervalos de percentual de cobertura dos grãos de arroz (A), trigo (B) e milho (C) com peritécios a partir da inoculação com discos de micélio: 0 (sem peritécios); 1 (1 a 10%); 2 (>10 a 30%); e 3 (>30%).

Para se comparar os isolados quanto à fertilidade sexual, as classes atribuídas individualmente a cada um dos 50 grãos foram integrada em um índice de fertilidade relativa (IFR, variando 0 a 100%), com base na frequência das classes na amostra de grãos (Mckinney, 1923):

$$IFR = \frac{\sum_{i=1}^4 (n_i f_i) \times 100}{t n_m}$$

Sendo,

n = nota

f = frequência da nota

t = total de grãos

n<sub>m</sub> = nota máxima da escala

### 3.4 Esporulação, germinação e viabilidade de macroconídios

Vinte e sete isolados foram avaliados, sendo oito isolados de *F. graminearum*, nove isolados *F. meridionale* e dez isolados de *F. cortaderiae*. A fecundidade dos isolados foi avaliada com base na produção de esporos assexuais (macroconídios) em meio de cultura. Para tal, colônias dos isolados selecionados foram cultivadas em meio SNA por sete dias com fotoperíodo de 12 h de luz e temperatura de 25 °C (Leslie & Summerell, 2006). A partir dessas culturas, os isolados foram purificados por meio de cultivo monospórico, ou seja, a partir de um único esporo produziu-se uma nova colônia em meio SNA por sete dias. Três discos de 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas dessas colônias e imersos em 5 mL de água destilada esterilizada (ADE) contendo 0,1 mL de Tween 0,001% em tubo de ensaio, que foi agitado por 20 s. A esporulação foi expressa em número de esporos/mL, após a contagem de esporos em câmara de Neubauer (Spolti *et al.*, 2012).

Para a avaliação da germinação, uma alíquota (1 mL) de uma suspensão de macroconídios foi incubada por 6 h sob condições de umidade, as lâminas foram

aconditionadas em bandejas com umidade de 100 % (Beyer *et al.*, 2005). Após, com auxílio de um microscópio, foi quantificado o número de esporos germinados em uma amostra 20 macroconídios, sendo a germinação expressa em porcentagem (Beyer *et al.*, 2005). Foram considerados germinados todos os esporos que formaram tubo germinativo.

### **3.5 Agressividade em espigas de trigo**

Dezessete isolados foram avaliados, sendo seis, cinco e seis isolados da espécie *F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae*, respectivamente. Sementes de trigo da cultivar BRS Guamirim, classificada como moderadamente resistente, foram semeadas em vasos (3 L) contendo substrato casca de arroz carbonizada (Tropstrato HT Hortaliças) e fertilizada com macronutrientes (4-14-8 NPK). Foram semeadas 10 sementes de trigo por vaso e, após o desbaste, foram mantidas até 10 espigas por vaso. Para a caracterização da agressividade, os isolados foram individualmente inoculados uma espiguetas central das plantas no estágio de grão massa mole do trigo, 85 da escala Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974; Engle *et al.*, 2003). As espigas selecionadas para inoculação tiveram a espiguetas central marcada e, com uma micropipeta, foi feita a inoculação de 20 µL de uma suspensão de esporos de 10<sup>5</sup> conídios/mL (Spolti *et al.*, 2012). Após a inoculação, as plantas foram incubadas a 25 °C em câmara de crescimento, com UR de 100%, por um período de 48 h. Após este período as plantas retornaram à casa de vegetação. Nas espigas inoculadas foi avaliada a severidade, ou a proporção de espiguetas gibereladas (Spolti *et al.*, 2012). A avaliação foi feita aos 24 dias após a inoculação. O experimento foi repetido uma vez.

### 3.6 Produção de tricotecenos *in vitro* em grãos

Vinte e nove isolados foram avaliados, sendo dez, nove e dez isolados de *F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae*, respectivamente. A produção de micotoxinas *in vitro* foi avaliada utilizando substrato de grãos de arroz ou de trigo, conforme descrito por Puri & Zhang (2010), com algumas modificações (Spolti *et al.*, 2014). Os grãos de arroz ou de trigo (20 g) foram armazenados em placas de Petri de vidro (60 x 90 mm), embebidos em 10 mL de água destilada e, posteriormente, esterilizados por 20 min a 120 °C uma vez por dia, durante três dias consecutivos. Após a autoclavagem, os grãos foram inoculados com três discos (0,6 mm de diâmetro) de BDA de colônias dos isolados desenvolvidas por sete dias de cada isolado separadamente. Utilizaram-se duas placas para cada isolado. As placas depois de inoculadas com os discos de micélio foram mantidas no escuro por 21 dias a 25 °C. Após esse período, as amostras foram retiradas das placas e acondicionadas em estufa a 60 °C durante 24 h e armazenadas em freezer.

#### 3.6.1 Extração e quantificação de tricotecenos

As micotoxinas foram extraídas seguindo o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), proposto por Tanaka *et al.* (2000), com modificações (Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2012). Os padrões analíticos dos tricotecenos, deoxinivalenol (DON), 3 acetil deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil deoxinivalenol (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<sup>®</sup> 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  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As condições cromatográficas foram por fase reversa Coluna: C18, Supelco, 25 cm x 4,6 mm, 10  $\mu\text{m}$ .

A biomassa fúngica produzida em substrato de arroz e trigo foram moídas em moinho de facas até a granulometria média de 40 mesh. Foram tomadas 10g de amostras em erlenmayer 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/800 g) 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 ressuspenso 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. Todas as determinações foram realizadas em triplicata no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

### **3.7 Análise estatística**

As espécies foram comparadas por meio de análise descritiva e análise de variação com os fatores já descritos em cada experimento. Para cada espécie, agrupando-se os valores dos isolados, foi calculado o valor médio e o intervalo de confiança (IC 95%) para cada uma das variáveis. A análise de contraste foi realizada

mantendo-se a ortogonalidade dos dados (3-1), sendo 3 o número de tratamentos (espécies). Assim, os contrastes efetuados foram entre a espécie predominante no trigo no sul do Brasil (Fgra) e as espécies observadas em menor frequência (Fmer e Fcor) e entre essas de menor frequência (Del Ponte *et al.*, 2014).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados

#### 4.1.1 Crescimento micelial em duas temperaturas em meio de cultura

Na análise de variância foi observada significância da interação entre espécie e temperatura ( $P = 0,030$ ) para o crescimento micelial (Tabela 3). Para a sensibilidade à temperatura houve efeito significativo das espécies ( $P < 0,001$ ; dado não apresentado).

A variância observada entre as temperaturas foi maior que entre as espécies (soma de quadrados), indicando que a interação entre esses dois fatores foi determinada pelo efeito majoritário da temperatura (Tabela 3, Figura 3). Assim, quando analisadas separadamente, não foi observada diferença nos contrastes (Tabela 4).

TABELA 3. Análise de variância da taxa de crescimento micelial de espécies do complexo *Fusarium graminearum* (FGSC) em meio de cultura, incubado nas temperaturas de 15 °C e 30 °C, em escuro contínuo.

Causas de variação	Soma de Quadrados	F	$P^b$
Espécie (E) <sup>a</sup>	0,024	0,354	0,703
Temperatura (T)	6,153	179,603	<0,001
E*T	0,248	3,627	0,030

<sup>a</sup> No ensaio cinco, sete e seis isolados de *F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae* foram utilizados para caracterizar as respectivas espécies.

<sup>b</sup> Significância da análise de variância.

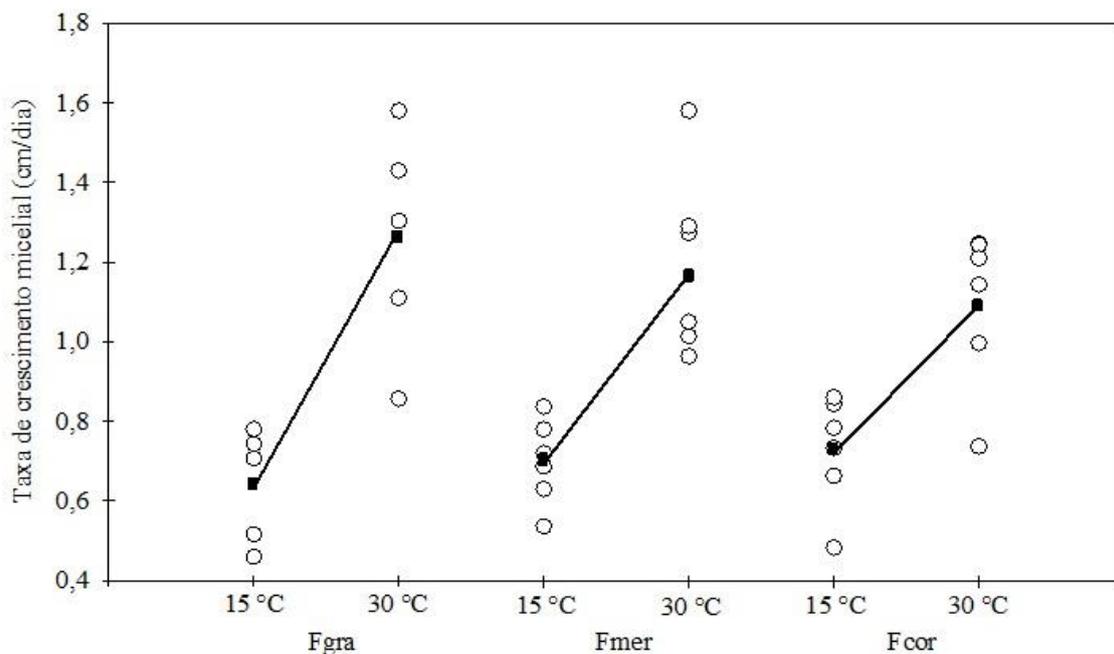


FIGURA 3. Taxa de crescimento micelial de *F. graminearum* (Fgra; n = 5), *F. meridionale* (Fmer; n = 7) e *F. cortaderiae* (Fcor; n = 6) incubados nas temperaturas de 15 °C e 30 °C. Círculos abertos representam a média de três repetições para cada isolado. Pontos pretos representam a média da taxa de crescimento de todos os isolados para cada uma das espécies em cada temperatura. A linha contínua indica a sensibilidade à temperatura pela variação na taxa de crescimento micelial com a variação na temperatura.

TABELA 4. Crescimento micelial médio e intervalo de confiança de 95% de espécies do complexo *Fusarium graminearum* incubadas em BDA em diferentes temperaturas. A variação ( $\Delta$ ) na taxa de crescimento indica a sensibilidade à temperatura das espécies.

Espécies <sup>a</sup>	Nº de isolados	Taxa de crescimento micelial (cm/dia)		$\Delta$ na taxa <sup>b</sup>
		15 °C	30 °C	
Fgra	5	0,64 ± 0,18	1,26 ± 0,09	1,96 ± 0,19
Fmer	7	0,70 ± 0,35	1,17 ± 0,20	1,69 ± 0,26
Fcor	6	0,73 ± 0,15	1,10 ± 0,21	1,52 ± 0,20
<i>Contrastes</i>		<i>P<sup>c</sup></i>		
Fgra vs. Fmer+Fcor		0,587	0,090	<0,001
Fmer vs. Fcor		0,513	0,295	0,045

<sup>a</sup>Fgra = *F. graminearum*, Fmer = *F. meridionale* e Fcor = *F. cortaderiae*.

<sup>b</sup>Sensibilidade à temperatura = tx. de crescimento em 30 °C / tx. de crescimento em 15 °C.

<sup>c</sup>Significância da análise de variância.

Isolados Fgra apresentaram uma maior sensibilidade à temperatura, pela maior variação (92%) no crescimento micelial com o aumento da temperatura de 15 °C para 30 °C (Figura 3, Tabela 4). Da mesma forma, Fmer apresentou uma maior sensibilidade à temperatura que Fcor ( $P = 0,045$ , Tabela 4). Assim, Fgra, Fmer e Fcor podem ser listadas em ordem crescente na sensibilidade à temperatura (Figura 3, Tabela 4).

#### 4.1.2 Formação e produção de peritécios em grãos

Todos os isolados produziram peritécios nos três substratos (Figura 4). Foi observado um gradiente na fertilidade entre isolados de uma mesma espécie, com maior variação entre os isolados quando inoculados em arroz e milho que em comparação a trigo (Figura 4).

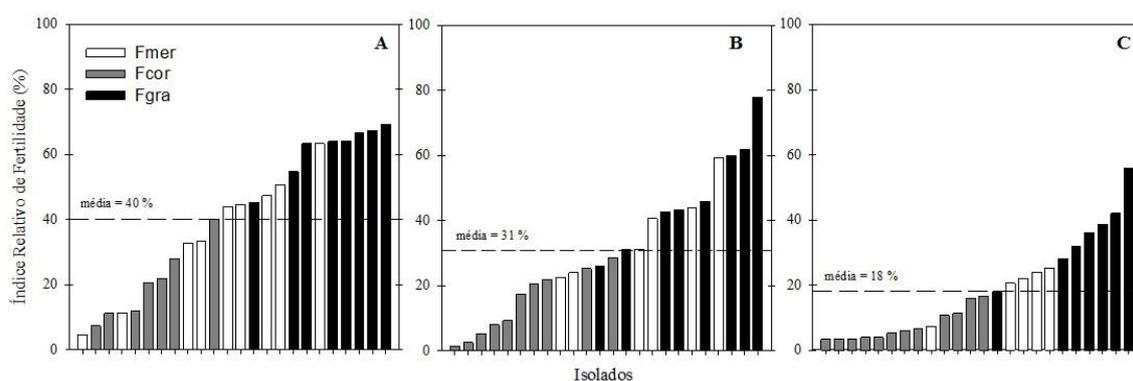


FIGURA 4. Distribuição, em ordem do menor a maior, do índice de fertilidade relativa com base na frequência e quantidade de peritécios produzidos em grãos, para 23 isolados de três espécies do FGSC (*F. graminearum* = Fgra, *F. meridionale* = Fmer e *F. cortaderiae* = Fcor, inoculados em substrato de arroz (A), milho (B) e trigo (C).

Houve diferença significativa no índice de fertilidade relativa entre as espécies ( $P < 0,001$ ) e os substratos ( $P < 0,001$ ), mas não foi observada interação significativa entre esses dois fatores (Tabela 5). A espécie foi o fator que apresentou a maior variância para a formação de peritécios ( $SQ = 13664$ ,  $F = 40,396$ ) (Tabela 5).

TABELA 5. Análise de variância nos dados de índice de fertilidade relativa (produção de peritécio) por três espécies do FGSC em substrato de grãos de arroz, milho e trigo.

Causas de variação	Soma de Quadrados	F	$P^b$
Espécie (E) <sup>a</sup>	13664	40,396	<0,001
Substrato (S)	5856	17,314	<0,001
E*S	718	1,061	0,383

<sup>a</sup> No ensaio oito, oito e sete isolados de *F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae* foram utilizados para caracterizar as respectivas espécies.

<sup>b</sup> Significância da análise de variância.

Os isolados apresentaram um maior índice de fertilidade relativa quando inoculados em grãos de arroz e milho do que em grãos de trigo para todas as espécies (Tabela 6). Ainda, independente do substrato, Fgra foi a espécie com maior fertilidade

(Tabela 6). Dessa forma, pela análise de contrastes, foi observada diferença significativa entre Fgra vs. Fmer+Fcor em grãos de arroz, milho e trigo ( $P < 0,001$ ).

Apesar de não ser observada interação significativa entre espécie e substrato para a formação de peritécios, foi observada maior fertilidade de Fmer em relação a isolados Fcor em grãos de arroz ( $P = 0,026$ ) e milho ( $P = 0,001$ ), mas não quando grãos de trigo foram utilizados como substrato ( $P = 0,126$ ) (Tabela 6).

TABELA 6. Índice médio de fertilidade relativa, e respectivo intervalo de confiança de 95 %, obtido com base na frequência e percentual da superfície de grãos de arroz, milho ou trigo coberta com peritécios por isolados de três espécies do FGSC

Espécies <sup>a</sup>	Nº de isolados	Substrato		
		Arroz	Milho	Trigo
Fgra	8	61,8 ± 6,6	48,6 ± 14,3	31,5 ± 13,4
Fmer	8	36,8 ± 14,4	31,8 ± 10,4	15,5 ± 6,2
Fcor	7	20,2 ± 10,4	10,8 ± 9,3	6,8 ± 4,4
<i>Contrastes</i>		<i>P<sup>b</sup></i>		
Fgra vs. Fmer+Fcor		<0,001	<0,001	<0,001
Fmer vs. Fcor		0,026	0,001	0,126

<sup>a</sup>Fgra = *F. graminearum*, Fmer = *F. meridionale* e Fcor = *F. cortaderiae*.

<sup>b</sup>Significância da análise de variância.

#### 4.1.3 Esporulação, germinação e viabilidade de macroconídios

Houve variação entre as espécies analisadas quanto à esporulação em meio artificial ( $P = 0,003$ ), germinação dos esporos ( $P = 0,001$ ) e no número de esporos viáveis ( $P = 0,007$ ) (Figura 5). Para a estimativa dos esporos viáveis foi utilizado o produto da esporulação e o respectivo valor da germinação.

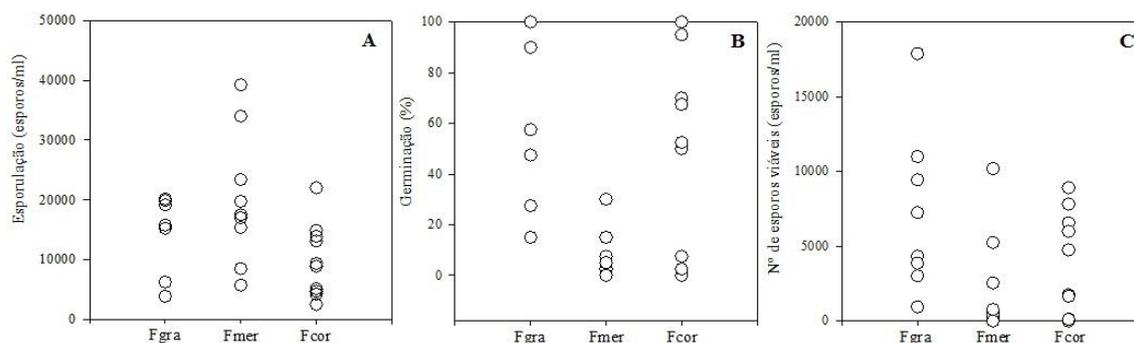


FIGURA 5. Distribuição dos valores de esporulação (A), germinação de macroconídios (B) e o número de esporos viáveis (C) para oito isolados de *F. graminearum* (Fgra), nove isolados *F. meridionale* (Fmer) e dez isolados de *F. cortaderiae* (Fcor). Os círculos representam cada um dos isolados em cada uma das espécies.

Todos os 27 isolados avaliados no ensaio produziram macroconídios em SNA (Tabela 7). Todos os oito isolados de Fgra germinaram, no entanto, 2/9 e 1/10 isolados de Fmer e Fcor não germinaram, respectivamente. Assim, a média do número viável de esporos entre as espécies também foi distinto, mas com alguma variação em relação aos valores observados para esporulação e germinação (Figura 5, Tabela 7).

Pela análise de contraste ortogonal a esporulação de Fgra em meio SNA não diferiu da média dos valores observados dentre os isolados Fmer e Fcor ( $P = 0,984$ ). No entanto, isolados Fmer esporularam mais do que isolados Fcor (Tabela 7). Fgra apresentou maior percentual germinação ( $P = 0,026$ ) e um maior número de esporos viáveis ( $P = 0,003$ ) em relação à média de Fmer+Fcor (Tabela 7).

TABELA 7. Número médio e intervalo de confiança 95% de esporos, percentual de germinação e número de esporos viáveis.

Espécie <sup>a</sup>	Nº de isolados	Esporulação (esporos/mL)	Germinação (%)	Esporos viáveis (esporos/mL)
Fgra	8	15,0x10 <sup>3</sup> ± 5,3x10 <sup>3</sup>	50,0 ± 26,7	7,2x10 <sup>3</sup> ± 4,6x10 <sup>3</sup>
Fmer	9	20,0x10 <sup>3</sup> ± 8,4x10 <sup>3</sup>	10,3 ± 9,3	2,2x10 <sup>3</sup> ± 2,6x10 <sup>3</sup>
Fcor	10	9,9x10 <sup>3</sup> ± 4,4x10 <sup>3</sup>	44,8 ± 28,0	3,8x10 <sup>3</sup> ± 2,4x10 <sup>3</sup>
<i>Contrastes</i>			<i>P<sup>b</sup></i>	
Fgravs.		0,984	0,026	0,003
Fmer+Fcor				
Fmer vs. Fcor		<0,001	0,002	0,168

<sup>a</sup>Fgra = *F. graminearum*, Fmer = *F. meridionale* e Fcor = *F. cortaderiae*.

<sup>b</sup>Significância da análise de variância.

Para esporulação e germinação as espécies Fmer e Fcor tiveram resultados distintos na comparação das médias. Enquanto Fmer apresentou maior média de esporulação ( $P = 0,002$ ) em relação a isolados Fcor (Tabela 7) a média de germinação dos esporos dos isolados Fmer foi inferior àquela dos isolados Fcor ( $P = 0,002$ ). Assim, não houve diferença entre Fmer e Fcor no número de esporos viáveis ( $P = 0,168$ ) (Tabela 7).

#### 4.1.4 Agressividade em espigas de trigo

Todos os isolados foram patogênicos e a severidade média observada foi de 36% (Figura 6).

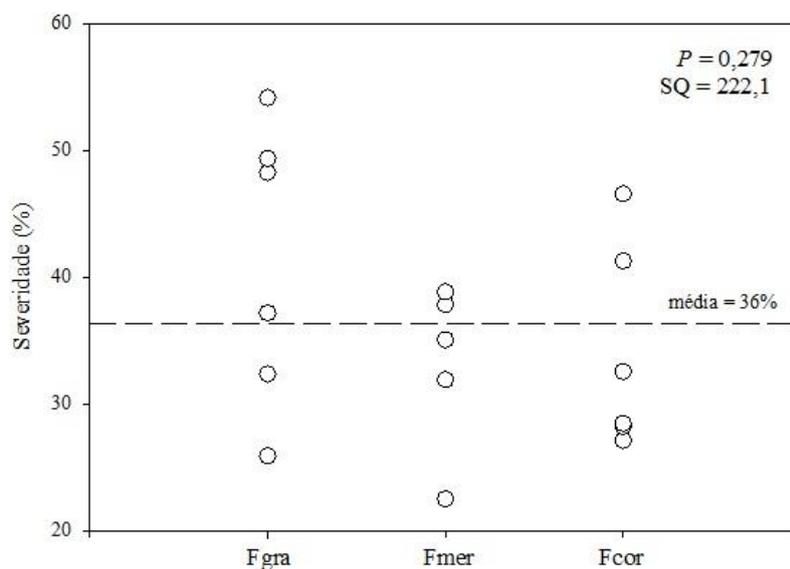


FIGURA 6. Severidade média de giberela na cultivar BRS Guamirim inoculada com 17 isolados do complexo *Fusarium graminearum* pertencentes a três espécies filogenéticas, sendo seis, cinco e seis isolados de *F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae* foram utilizados para caracterizar as respectivas espécies (Fgra, Fmer e Fcor).

Não foi observado efeito significativo entre espécies ( $P = 0,279$ ; Figura 6) na cultivar BRS Guamirim (Tabela 8). Pela análise de contraste não foi observada diferença significativa entre Fgra vs. Fmer+Fcor ( $P = 0,116$ ; Tabela 8). Apesar de não ser observada diferença significativa entre espécie em relação à severidade de doença, foi observada uma maior severidade de doença de isolados Fcor em relação a isolados Fmer (Tabela 8).

TABELA 8. Severidade média da doença (%) e intervalo de confiança de 95 % pela inoculação de espécies do complexo *Fusarium graminearum* na cultivar BRS Guamirim.

Espécies <sup>a</sup>	Nº de isolados	BRS Guamirim
Fgra	6	41,1 ± 11,6
Fmer	5	33,2 ± 8,1
Fcor	6	34,0 ± 8,4
<i>Contraste</i>		<i>P<sup>b</sup></i>
Fgra vs. Fmer+Fcor		0,116
Fmer vs. Fcor		0,883

<sup>a</sup> Fgra = *F. graminearum*, Fmer = *F. meridionale* e Fcor = *F. cortaderiae*.

<sup>b</sup> Significância da análise de variância.

#### 4.1.5 Produção de tricotecenos *in vitro* em grãos

Nos isolados amostrados foram detectados apenas as formas acetiladas de DON e nivalenol. A produção total de tricotecenos foi maior em substrato de arroz em comparação ao substrato de trigo (Figura 7). Foi observado coerência entre o genótipo tricoteceno e a micotoxina produzida para a maioria dos isolados (Figura 7). No entanto, em substrato de arroz, um isolado Fgra com genótipo 15-ADON apresentou quimiotipo NIV, um isolado Fmer com genótipo NIV apresentou quimiotipo 3-ADON e um isolado Fcor com genótipo NIV apresentou quimiotipo 15-ADON (Figura 7). Em substrato de trigo, apenas um isolado Fmer com genótipo NIV apresentou um quimiotipo 15-ADON.

Na análise de variância, mantendo-se constante o número de isolados entre os substratos foi observado efeito significativo das espécies para a concentração de 15-ADON e NIV ( $P < 0,001$ ), mas não foi observado efeito significativo para a concentração de 3-ADON ( $P = 0,465$ ) (Tabela 9).

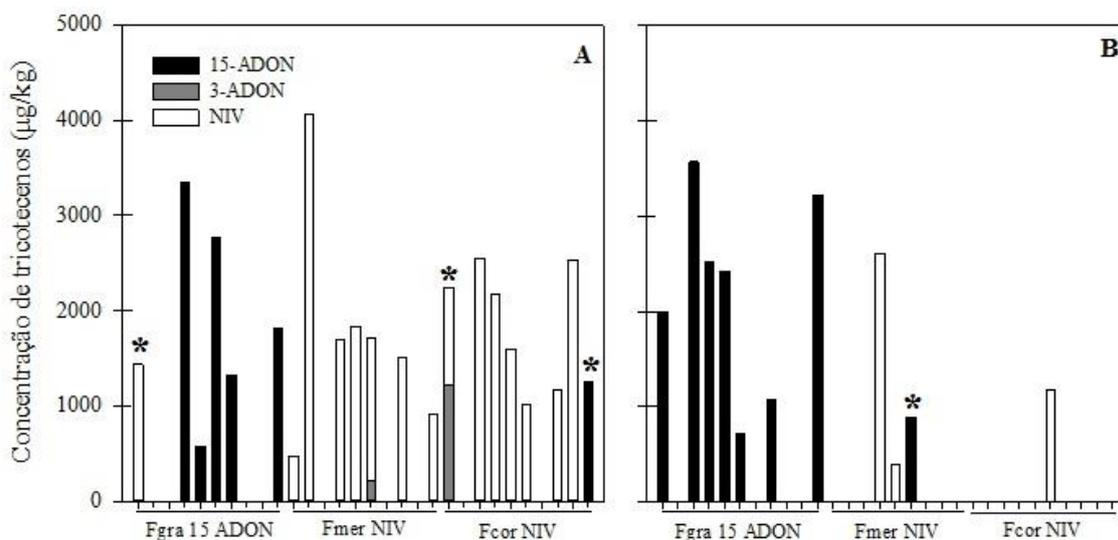


FIGURA 7. Concentração de tricotecenos de 30 isolados do FGSC pertencentes a três espécies filogenéticas, sendo dez, dez e dez isolados de *F. graminearum* (Fgra), *F. meridionale* (Fmer) e *F. cortaderiae* (Fcor) foram utilizados para caracterizar as respectivas espécies nos substratos de arroz (A) e trigo (B). Os asteriscos indicam os isolados com quimiopagagem inconsistente com o genótipo tricoteceno.

O substrato foi uma causa significativa para o concentração de NIV ( $P < 0,001$ ) e para a concentração total de tricotecenos (15-ADON + 3-ADON + NIV) ( $P = 0,035$ ) (Tabela 9). Houve interação significativa entre espécie e substrato apenas para o total de tricotecenos ( $P = 0,030$ ) (Tabela 9).

TABELA 9. Análise de variância da produção de micotoxina in vivo de espécies do FGSC em substratos de grãos de arroz e trigo.

Causas de variação	15-ADON		3-ADON		NIV		Total	
	F	$P^b$	F	$P$	F	$P$	F	$P$
Espécie (E) <sup>a</sup>	14,868	<b>&lt;0,001</b>	0,778	0,465	5,266	<b>0,008</b>	1,524	0,227
Substrato (S)	0,752	0,390	1,345	0,252	13,328	<b>&lt;0,001</b>	4,662	<b>0,035</b>
E*S	0,969	0,388	0,778	0,465	2,285	0,111	3,745	<b>0,030</b>

<sup>a</sup> No ensaio dez, nove e dez isolados de *F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae* foram utilizados para caracterizar as respectivas espécies.

<sup>b</sup> Valor de  $P$  onde os valores em negrito indicam significância ao nível de probabilidade de 5%.

Apenas dois isolados produziram 3-ADON, sendo um isolado Fmer e outro Fcor (Figura 7). Como não houve efeito significativo das causas de variação sobre esta micotoxina, as análises seguintes irão detalhar apenas a concentração de 15-ADON e NIV (Tabela 10) ou o total de tricotecenos (Tabela 11).

De forma coerente com os respectivos genótipos tricotecenos, a espécie Fgra produziu mais 15-ADON que Fmer e Fcor ( $P = 0,006$ ) indiferente ao substrato (Tabela 10). Da mesma forma, ambas as espécies com genótipo NIV produziram mais dessa micotoxina que a espécie Fgra ( $P < 0,001$ ) (Tabela 10). Entre as espécies Fmer e Fcor não houve diferença na síntese de 15-ADON ( $P = 0,549$ ) ou NIV ( $P = 0,959$ ) (Tabela 10).

TABELA 10. Concentrações médias de tricotecenos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e intervalo de confiança de 95 % produzidos por espécies do FGSC em dois substratos inertes (arroz e trigo). As médias das micotoxinas foram agrupadas indiferente ao substrato, pois não foi observada interação significativa para tais tricotecenos.

Espécies <sup>a</sup>	Nº de isolados	Tricotecenos	
		15-ADON	NIV
Fgra	10	1268,0 $\pm$ 618,0	71,7 $\pm$ 150,1
Fmer	9	49,4 $\pm$ 104,3	833,7 $\pm$ 576,7
Fcor	10	62,7 $\pm$ 131,3	661,0 $\pm$ 432,4
<i>Contrastes</i>		<i>P<sup>b</sup></i>	
Fgra vs. Fmer+Fcor		0,006	< 0,001
Fmer vs. Fcor		0,540	0,959

<sup>a</sup> Fgra = *F. graminearum*, Fmer = *F. meridionale* e Fcor = *F. cortaderiae*.

<sup>b</sup> Significância da análise de variância.

A concentração total de tricotecenos em grãos de trigo foi maior com a inoculação de isolados Fgra em relação às outras duas espécies ( $P = 0,002$ ; Tabela 11).

Os demais contrastes não foram significativos (Tabela 11).

TABELA 11. Concentração média total de tricotecenos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e intervalo de confiança de 95 % produzidos por espécies do FGSC em grãos de arroz ou trigo. Análise realizada considerando a interação entre as espécies e o substrato para a concentração total de tricotecenos.

Espécies <sup>a</sup>	Nº de isolados	Concentração total de tricotecenos	
		Arroz	Trigo
Fgra	10	1127,6 $\pm$ 880,8	1551,9 $\pm$ 980,3
Fmer	9	1358,6 $\pm$ 961,1	432,2 $\pm$ 669,8
Fcor	10	1451,6 $\pm$ 767,3	118,0 $\pm$ 266,9
<i>Contrastes</i>		<i>P<sup>b</sup></i>	
Fgra vs. Fmer+Fcor		0,541	0,002
Fmer vs. Fcor		0,861	0,485

<sup>a</sup> Fgra = *F. graminearum*, Fmer = *F. meridionale* e Fcor = *F. cortaderiae*.

<sup>b</sup> Significância da análise de variância.

## 4.2 Discussão

Na avaliação do efeito da temperatura no crescimento micelial, a grande variação observada entre isolados de uma mesma espécie não permitiu detectar diferenças entre as espécies nas duas temperaturas. No entanto, Fgra apresentou uma maior resposta média, ou sensibilidade, ao incremento da temperatura comparado com Fmer + Fcor, a qual é uma variável sugerida para indicar potencial de adaptação térmica (Zhan & McDonald, 2011; Backhouse *et al.*, 2014; Spolti *et al.*, 2014) e adaptabilidade saprofítica (Tunali *et al.*, 2012).

Esse resultado é similar aos obtidos por Spolti *et al.* (2012), que utilizaram um número menor de isolados (quatro) e não observaram diferença entre Fgra e Fmer no

crescimento micelial a 10 °C, 15 °C, 20 °C ou 35 °C, mas apenas nas temperaturas de 25 °C e 30 °C. Essa diferença pode estar relacionada ao menor número de isolados utilizados naquele estudo (dois por espécie), haja vista a variação observada em uma amostra maior, conforme o presente estudo com cinco a sete isolados de cada espécie.

A sobrevivência de *F. graminearum* na entressafra e a produção do inóculo para as infecções primárias ocorrem através da formação de peritécios nos restos culturais (Khonga & Sutton, 1988; Shaner, 2003; Pereyra & Dill-Macky, 2004; Gilbert & Fernando, 2004). Assim, a fertilidade sexual têm importância fundamental na ecologia da doença (McMullen *et al.*, 2012; Gilbert & Haber, 2013; Leplat *et al.*, 2013). No entanto, poucos são os estudos que caracterizam os isolados ou as espécies do complexo *F. graminearum* quanto à formação e produção de peritécios (Lee *et al.*, 2012; Spolti *et al.*, 2014).

O presente estudo relata pela primeira vez a caracterização da fertilidade inferida pela frequência quantidade de peritécios produzidos em grãos, na respectiva ordem: Fgra > Fmer > Fcor. É interessante notar que a fertilidade sexual dessas espécies segue a mesma ordem de frequência dessas em grãos de trigo no Sul do Brasil (Astolfi *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2012; Del Ponte *et al.*, 2014).

Lee *et al.* (2009) recuperou 247 ascósporos, um de cada peritécio, e deste total 87% eram da espécie Fasi, seguidos da espécie Fgra (13%) e não foi detectado nenhum Fboo. Assim, também relatou diferença na fertilidade sexual entre espécies do FGSC e, assim como no presente estudo, Fgra apresentou uma maior fertilidade que isolados Fmer.

Em três campos de trigo da região norte do estado do Rio Grande do Sul, Del Ponte *et al.* (2014) determinaram a frequência das espécies do FGSC em resteva de milho e em espigas de trigo com sintomas de giberela. A frequência de Fmer ou Fcor na

resteva de milho foi maior que a de Fgra. Contrariamente, Fgra foi a espécie mais frequente nas espigas de trigo. No entanto, em colmos de trigo naturalmente infectados a sobrevivência de *F.graminearum* tende a ser menor que a de outras espécies do gênero, como *F. verticillioides*, que é um patógeno importante da cultura do milho (Palazzini *et al.*, 2013).

Assim, Del Ponte *et al.* (2014) inferiram que a diferença na frequência dessas espécies nesses diferentes habitats estaria associada a uma maior aptidão patogênica já que peritécios em colmos de milho são oriundos de podridão do colmo causadas por Fmer e Fcor. No presente trabalho, Fgra indiferente ao substrato produziu uma maior quantidade de peritécios que Fmer ou Fcor. Assim, a maior frequência de Fgra em grãos de trigo seria devido a abundância de inóculo Fgra no ar atmosférico oriundo de outras fontes de inóculo além da resteva do milho, associado à vantagens patogênicas em trigo (Del Ponte *et al.*, 2014).

A reprodução assexual de *F. graminearum* é responsável pela disseminação do patógeno a curtas distâncias (Parry *et al.*, 1995; Fernando *et al.*, 1997). A produção de macroconídios em meio de cultura como o SNA é usada para mimetizar o substrato natural (Sung & Cook, 1980), o que pode indicar possíveis diferenças na fertilidade entre as espécies e, portanto, de produzir inóculo para as infecções pelo patógeno no trigo (Leplat *et al.*, 2013).

Não foi observada diferença entre Fgra e a média combinada das demais espécies aqui avaliadas. No entanto, Fmer apresentou uma maior esporulação que Fcor. Spolti *et al.* (2012) e Spolti & Del Ponte (2013) relataram maior esporulação ( $\geq 1,5x$ ) para Fgra que Fmer. No entanto, os isolados utilizados nesses dois estudos prévios foram diferentes dos caracterizados no presente trabalho. Ainda, no presente estudo é

relatada pela primeira vez a caracterização da esporulação de Fcor, sendo inferior a da espécie Fmer (~2x).

Spolti *et al.* (2012) avaliaram a germinação de dois isolados Fgra e dois isolados Fmer e não observaram diferença significativa entre as duas espécies. No entanto, os dados do presente estudo mostram que a germinação de macroconídios foi maior para Fgra em relação às outras duas espécies e que, Fcor apresentou maior germinação que Fmer (Fgra > Fcor > Fmer), assim, os dados corroboram com Spolti & Del Ponte (2013), onde com um conjunto de 19 isolados foi também observada maior germinação de esporos de Fgra em comparação a Fmer. A estimativa de esporos viáveis (esporulação x germinação) indica uma maior adaptabilidade de Fgra na fase assexuada do patógeno em relação às outras duas espécies menos frequentes em trigo e aqui caracterizadas (Fmer e Fcor).

Assim, considerando a assincronia na floração de espigas dentro de uma lavoura (Reis, 1988) e da possibilidade de infecções secundárias (Paul *et al.*, 2007), é possível que Fgra tenha maior oportunidade de infectar espigas pela disseminação secundária do patógeno. No entanto, essa hipótese deve ser testada com experimentos específicos e com a utilização de técnicas como *fingerprint* (Keller *et al.*, 2011).

Ao contrário do relatado por Spolti *et al.* (2012), que também utilizou a cultivar BRS Guamirim e a inoculação da espigeta central, não foi observado diferença na agressividade de espécies do complexo *F. graminearum*. A severidade média observada por Spolti *et al.* (2012) na cultivar BRS Guamirim quando inoculado com isolados de Fgra foi de 73% e de 22% para os isolados Fmer, apresentando severidades médias de Fgra superiores as observados neste trabalho. No entanto, Spolti *et al.* (2012) inoculou as plantas em antese plena o que pode ter favorecido a maior severidade e discriminação entre as espécies. No presente estudo as plantas foram inoculadas em estágios

posteriores à floração, o que pode explicar a contradição, além do fato de se ter utilizado maior número de isolados do que em Spolti *et al.* (2012).

A capacidade de discriminar as espécies do FGSC (Goswami & Kistler, 2005; Spolti *et al.*, 2012; Spolti & Del Ponte, 2013) ou os genótipos tricotecenos (Puri & Zhong, 2010; Spolti *et al.*, 2014) parece ser influenciada pelo método de inoculação e pelo número de isolados utilizados. A utilização de um maior número de isolados com maior variância entre os indivíduos de uma mesma espécie do que entre as espécies, reduz a nitidez dos agrupamentos testados (espécies ou genótipos tricotecenos) (Spolti *et al.*, 2014).

Pela primeira vez foi analisada a produção de tricotecenos *in vitro* por espécies predominantes do FGSC no Sul do Brasil. O genótipo tricoteceno vem sendo utilizado como informação preditiva do perfil toxigênico de populações do FGSC em estudos populacionais, com uma certa consistência entre genótipo e quimiotipo (Ward *et al.*, 2002; Chandler *et al.*, 2003; Quarta *et al.*, 2006). No entanto, são relatadas algumas incoerências (Mugrabi de Kupler *et al.*, 2011; Sampietro *et al.*, 2012). Alexander *et al.* (2011) descrevendo a genética associada à síntese de tricotecenos por *F. graminearum* mostraram que a incoerência entre o genótipo e o quimiotipo pode estar associada à capacidade do fungo em utilizar DON como substrato para a formação de formas acetiladas da toxina.

No presente estudo, a concordância entre genótipo e quimiotipo tricoteceno foi de 90% indiferente ao substrato utilizado (arroz e trigo). Apesar do número restrito de isolados, essa informação corrobora com estudos populacionais do FGSC em trigo no Sul do Brasil (Del Ponte *et al.*, 2014), onde o genótipo tricoteceno vem sendo utilizado como indicativo das toxinas potencialmente produzidas pela população do patógeno.

Um dos isolados Fcor utilizados no presente estudo, genótipo nivalenol, foi quimiotipado em substrato arroz como quimiotipo 3-ADON. Del Ponte *et al.* (2014) mostram que Fcor pode apresentar os dois tipos de genótipo tricoteceno no sul do país. Portanto, esse isolado deve ser novamente genotipado ou quimiotipado para confirmação.

O arroz é o substrato padrão utilizado para a quimiotipagem de isolados das espécies do FGSC (Puri & Zhong, 2010; Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2012). No presente estudo, a frequência da detecção dos tricotecenos entre os isolados avaliados foi maior em arroz do que em trigo, particularmente para nivalenol. Isso explica a interação entre o substrato e espécie na concentração do total de tricotecenos. Pela maior frequência de espécies com genótipo nivalenol no Brasil em relação a outras regiões como EUA e Europa (Tóth *et al.*, 2005; Schmale *et al.*, 2011; Somma *et al.*, 2014), sugere-se que o arroz deva ser utilizado como substrato padrão para este tricoteceno.

Indiferente ao substrato, Fgra produziu uma maior quantidade de 15-ADON que Fmer+Fcor, da mesma forma que essas duas espécies produziram uma maior concentração de nivalenol que Fgra. Novamente, mostrando o valor da genotipagem como informação preditiva do perfil toxicológico nos estudos populacionais do FGSC.

## 5 CONCLUSÕES

A espécie *Fusarium graminearum* apresenta vantagens competitivas quando comparado as espécies *F. meridionale* e *F. cortaderiae* quanto à sensibilidade do micélio à temperatura em meio de cultura, a produção de peritécios em grãos e a produção de micotoxinas.

Não é possível diferenciar as espécies do complexo *Fusarium graminearum* quanto à agressividade em cultivar com nível moderado de resistência genética (BRS Guamirim) quando inoculado em estágio de grão massa mole.

A produção de micotoxinas 15-ADON e NIV dos isolados *in vitro* é, na maioria dos casos, consistente com a genotipagem dos isolados.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITRIGO. **Informativo produção de trigo ano 2013**. Disponível em: <[http://www.abitrigo.com.br/pdf/mdic/importacao\\_trigo.pdf](http://www.abitrigo.com.br/pdf/mdic/importacao_trigo.pdf)>. Acesso em: 09 set. 2013.

ALEXANDER, N. *et al.* The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, Philadelphia, v. 48, p. 485 – 495, 2011.

ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 26 fev. 2011. Seção 1, p. 66.

AOKI T. *et al.* Systematics, Phylogeny and Trichothecene Mycotoxin Potential of *Fusarium graminearum* Head Blight Cereal Pathogens. **JSM Mycotoxins**, Tóquio, v. 62, n. 2, p. 91-102, 2012.

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, n. 3, 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**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 289-295, 2012.

BACKHOUSE, D. Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 139, n. 1, p. 161–173, 2014.

BAKAN, B. *et al.* Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 11, p. 998-1003, 2001.

BEYER, M.; VERREET, J. A. Germination of *Gibberella zeae* ascospores as affected by age of spores after discharge and environmental factors. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 111, n. 4, p. 381–389, 2005.

BRENNAN, J. M. *et al.* Comparison of commercial European wheat cultivars to *Fusarium* infection of head and seedling tissue. **Plant Pathology**, Wageningen, v. 56, p. 55–64, 2007.

BROWN, N. A. *et al.* The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonization in wheat ears. **Fungal Biology**, Philadelphia, v. 114, p. 535–571, 2010.

BROWN, N. A. *et al.* Characterisation of the *Fusarium graminearum* – wheat floral interaction. **Journal of Pathogens**, Nova York, v. 2011, 2011.

BURLAKOTI, R. R. *et al.* Trichothecene profiling and population genetic analysis of *Gibberella zeae* from barley in North Dakota and Minnesota. **Phytopathology**, St. Paul, v. 101, p. 687-695, 2011.

CASA, R. T. *et al.* Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 289–293, 2004.

CHANDLER, E. A. *et al.* Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Philadelphia, v. 62, n. 6, p. 355–367, 2003.

CHEN, Y.; ZHOU, M. G. Characterization of *Fusarium graminearum* isolates resistant to both carbendazim and a new fungicide JS399-19. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, p. 441-446, 2009.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira**: – grãos. Safra 2012/2013. Brasília: Conab, 2013. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_04\\_09\\_10\\_27\\_26\\_boletim\\_graos\\_abril\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_27_26_boletim_graos_abril_2013.pdf)>. Acesso em: 01 out. 2013.

COWGER, C.; ARELLANO, C. Plump kernels with high deoxynivalenol linked to late *Gibberella zeae* infection and marginal disease conditions in winter wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 7, p. 719-728, 2010.

DEL PONTE, E. M. *et al.* Giberela do trigo: aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 587-605, 2004.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R. Factors affecting density of airborne *Gibberella zeae* inoculum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 55-60, 2005.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; BERGSTROM, G. C. Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 155, n. 10, p. 577-581, 2007.

DEL PONTE, E. M. *et al.* A model-based assessment of the impacts of climate variability on *Fusarium* head blight seasonal risk in southern Brazil. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 157, n. 11 -12, p. 675-681, 2009.

DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head

blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 132, n. 2, p. 1087-1091, 2012.

DEL PONTE E. M. *et al.* Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, Oxford, 2014.

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.

ENGLE, J. S.; MADDEN, V. L., LIPPS, P. E. Evaluation of Inoculation Methods to Determine Resistance Reactions of Wheat to *Fusarium graminearum*. **Plant Disease**, Wooster, v. 87, p. 1530-1535, 2003.

EUDES, F. *et al.* Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 23, p. 318-322, 2001.

FAO. **Economic and Social Development Department**> Food Security Statistics> Data> Food security data and definitions> Diet composition> Food consumption pattern of main food items, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/ess/ess-fs/fs-data/ess-fadata/en/>>. Acesso em: 15 jun. 2011.

FAOSTAT. **Banco de dados**. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 10 out. 2012.

FERNANDO, W. G. D. *et al.* Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat plots. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 414-421, 1997.

FURLONG, E. B. *et al.* Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag, 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**, St. Paul, v. 92, n. 12, p. 1315-1322, 2002.

GALE, L. R. *et al.* Aggressiveness and mycotoxin potential of U.S. *Fusarium graminearum* populations in field-grown wheat and barley. In: NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, n.º., 2009, Orlando. Proceedings. Orlando: Editora, 2009. p. 173.

GANG, G. *et al.* Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness towards winter rye. **Phytopathology**, Oxford, v. 88, n. 9, p. 879-884, 1998.

GILBERT, J.; FERNANDO, W. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* / *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 26, p. 464–472, 2004.

GILBERT, J.; HABER, S. Overview of some recent research developments in *Fusarium* head blight of wheat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 35, n. 2, p. 149 – 179, 2013.

GOMES, L. *et al.* Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. **Plant Pathology**, 2014.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 515-525, 2004.

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. 1397-1404, 2005.

HALLEN, H. E.; TRAIL, F. The L-type calcium ion channel Cch1 affects ascospore discharge and mycelial growth in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Eukaryot Cell**, Washington, DC, v. 7, n. 2, p. 415–424, 2008.

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.

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.

JANSEN, C. *et al.* Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. **PNAS**, Washington, v. 102, n. 46, p. 16892-16897, 2005.

KELLER, M. D.; THOMASON, W. E.; SCHMALE III, D. G. The spread of a released clone of *Gibberella zeae* from different amounts of infested corn residue. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, n. 11, p. 1458-1464, 2011.

KHONGA, E. B.; SUTTON, J. C. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 10, n. 3, p. 232 – 239, 2009.

KUHNEM JÚNIOR, P. R. *et al.* Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 583-588, 2013.

KUHNEM JÚNIOR, P. R. *et al.* *Fusarium graminearum* isolates from Wheat and Maize in New York Show Similar Range of Aggressiveness and Toxigenicity in Cross-Species Pathogenicity Tests. **Phytopathology**, St. Paul, 2014.

LANDSCHOOT, S. *et al.* Connection between primary *Fusarium* inoculum on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheatears in Flanders, Belgium. **Crop Protection**, Philadelphia, v. 30, n. 10, p. 1297–1305, 2011.

LANGSETH, W. *et al.* Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereal. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 144, n. 2, p. 103-113, 1999.

LEATHERHEAD FOOD RESEARCH. : an International Overview of Maximum Limits. Leatherhead: Leatherhead Food Research, 2010.

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.

LEPLAT, J. *et al.* Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. **A review. Agricultural Sustainable Development**, Dijon Cedex, v. 33, n. 1, p. 97-111, 2013.

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

LORI, G. A. *et al.* *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiological Research**, Jena, v. 158, n. 1, p. 29-35, 2003.

MALBRÁN, I. *et al.* Toxigenic capacity and trichothecene production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and their relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 4, p. 357-364, 2014.

McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-217, Nov., 1923.

McMULLEN, M.; JONES, R.; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 12, p. 1340-1348, 1997.

McMULLEN, M. *et al.* A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 12, p. 1712-1728, 2012.

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**, Philadelphia, v. 151, n. 1, p. 78-86, 2011.

MUTHOMI, J. W. *et al.* Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 107, n. 2, p. 113-123, 2000.

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, n. 3, p. 384-392, 2012.

O'DONNELL, K. *et al.* Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum* the fungus causing wheat scab. **PNAS**, Washington, v. 97, n. 14, p. 7905-7910, 2000.

O'DONNELL, K. *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, n. 6, 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, p. 1514-1522, 2008.

PALAZZINI, J. M. *et al.* Biocontrol and population dynamics of *Fusarium* spp. On wheat stubble in Argentina. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 859-866, 2013.

PAN, D. *et al.* Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 162, n. 1, p. 120-123, 2013.

PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 189-192, 2003.

PANTHI, A. *et al.* Chemotype and aggressiveness of isolates of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Nebraska. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 36, n. 4, p. 447-455, 2014.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; MCLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small-grain cereals - a review. **Plant Pathology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 207-238, 1995.

PAUL, P. A. *et al.* A distributed lag analysis of the relationship between *Gibberella zeae* inoculum density on wheat spikes and weather variables. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 12, p. 1608-1624, 2007.

- PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R.; SIMS, A. L. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 7, p. 724-730, 2004.
- PINTO, V. E. F. *et al.* Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 157-62, 2008.
- PRITSCH, C. *et al.* Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, n. 2, p. 159-169, 2000.
- PRUSSIN, A. J. **Monitoring and predicting the long distance transport of *Fusarium graminearum*, causal agent of *Fusarium* head blight in wheat and barley.** 2013. 172 p. Thesis (Ph.D.) - Virginia Tech, Blacksburg, 2013.
- PURAHONG, W. *et al.* Aggressiveness of different *Fusarium graminearum* chemotypes within a population from Northern-Central Italy. **Mycoscience**, Tokyo, v. 55, n. 1, p. 63-69, 2014.
- PURI, K. D.; ZHONG, S. The 3-ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15-ADON population in spring wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 10, p. 1007-1014, 2010.
- QU, B. *et al.* Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 15 – 24, 2008.
- QUARTA, A. *et al.* Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. **FEMS Microbiol. Lett**, Oxford, v. 259, n. 1, p. 7-13, 2006.
- 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**, Wageningen, v. 115, n. 2, p. 139-48, 2006.
- REIS, E. M. **Doenças do trigo III.** Giberela. 2. ed. São Paulo: Editora, 1988.
- REIS, E. M. Perithecial formation of *Gibberella zeae* on senescent stems of grasses under natural conditions. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 52-54, 1990.
- REIS, E. M. *et al.* Grain losses caused by the infection of wheat heads by *Gibberella zeae* in southern Brazil, from 1984 to 1994. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 22, p. 134-137, 1996.
- REIS, E., *et al.* Decomposition of corn and soybean residues under field conditions and their role as inoculum source. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 65-67, 2011.

REIS, E. M.; CARMONA, M. A. Integrated disease management of *Fusarium* head blight. In: MAGLIANO, T. M. A.; CHULZE, S. N. (Ed.). ***Fusarium head blight in Latin America***. Oxford: Springer, 2013. p. 159-174.

SAMPIETRO, D. A. *et al.* A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. ***Fungal Biology***, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 74-81, 2012.

SANTIN, E. *et al.* Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. ***Ciência Rural***, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 185-190, 2001.

SARVER, B. J. *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. 1096-107, 2011.

SCHMALE III, D. G.; SHIELDS, E. J.; BERGSTROM, G. C. Night-time spore deposition of the *Fusarium* head blight pathogen, *Gibberella zeae*, in rotational wheat fields. ***Canadian Journal of Plant Pathology***, Ontario, v. 28, n. 1, p. 100-108, 2006.

SCHMALE III, D. G. *et al.* Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. ***Plant Pathology***, Oxford, v. 60, n. 5, p. 909–917, 2011.

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, n. 2, p. 344-351, 2009.

SHANER, G. E.; Buechley G. Relation between head blight and grain quality in the Indiana FHB epidemic of 2003. In: NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, 2003, Michigan. ***Proceedings...*** Michigan: [s.n.], 2003. p. 178–81.

SOMMA, S. *et al.* Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterization of their molecular and chemical chemotypes. ***Crop and Pasture Science***, Melbourne, v. 65, n. 1, p. 52 – 60, 2014.

SPOLTI, P. *et al.* Phenotypic and pathogenic traits of two species of the *Fusarium graminearum* complex possessing either 15-ADON or NIV genotype. ***European Journal of Plant Pathology***, Wageningen, v. 133, n. 3, p. 621-629, 2012.

SPOLTI & DEL PONTE. 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, n.9, p.1569-1575, 2013.

SPOLTI, P. *et al.* Fitness Attributes of *Fusarium graminearum* Isolates from Wheat in New York Possessing a 3-ADON or 15-ADON Trichothecene Genotype. ***Phytopathology***, St. Paul, v. 104, n. 5, p. 513-519, 2014.

SUGA, H. *et al.* Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. ***Phytopathology***, St. Paul, v. 98, n. 2, p. 159-166, 2008.

SUNG, J. M.; COOK, R. J. Effect of Water Potential on Reproduction and Spore Germination by *Fusarium roseum* 'Graminearum', 'Culmorum' and 'Avenaceum'. **Ecology and Epidemiology**, v. 71, p. 499–509, 1980.

SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 4, n. 2, p. 195-209, 1982.

TANAKA, T. *et al.* Improved methodology for the simultaneous detection of the tricothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. **Food additives and contaminants**. Abingdon, v. 2, n.2, p. 125-37, 1985.

TÓTH, B. *et al.* Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 113, n. 1, p. 35-45, 2005.

TRAIL, F. *et al.* Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 181-189, 2002.

TRAIL, F. For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 103-110, 2009.

TUNALI, B. *et al.* Fitness of three *Fusarium* pathogens of wheat. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 596 – 609, 2012.

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**, Philadelphia, v. 166, n. 1, p. 135-40, 2013.

VON DER OHE, C. *et al.* A comparison of aggressiveness and deoxynivalenol production between Canadian *Fusarium graminearum* isolates with 3-acetyl and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes in field-grown spring wheat. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 127, n. 3, p. 407–417, 2010.

WANG, J. A. *et al.* Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. **Toxins**, Basel, v. 3, n. 8, p. 1020-1037, 2011.

WARD, T. J. *et al.* Ancestral polymorphisms and adaptive evolution in the tricothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium graminearum*. **PNAS**, Washington, v. 99, n. 14, p. 9278-9283, 2002.

WARD, T. J. *et al.* 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**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 473-484, 2008.

XU, X. *et al.* Relationship between the incidences of ear and spikelet infection of *Fusarium* ear blight in wheat. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 110, n. 9, p. 959-971, 2004.

ZADOKS, J. *et al.* A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, p. 415-421, 1974.

ZHAN, J.; McDONALD, B. A. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 1689-1701, 2011.