

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

COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium graminearum* EM MILHO E TRIGO:
ASPÉCTOS ECOLÓGICOS, PATOGÊNICOS E TOXIGÊNCIOS DE ISOLADOS
DO SUL DO BRASIL E NORDESTE DOS ESTADOS UNIDOS

Paulo Roberto Kuhnem Junior
Mestre em Produção Vegetal - UDESC

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Dezembro de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Kuhnem Júnior, Paulo Roberto
Ecologia, patogenicidade e potencial toxigênico
do complexo de espécies *Fusarium graminearum* em
milho e trigo / Paulo Roberto Kuhnem Júnior. -- 2014.
79 f.

Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Fitopatologia. 2. Epidemiologia. 3. Biologia
de populações. 4. Micotoxinas. 5. Tricotecenos. I.
Del Ponte, Emerson Medeiros, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A minha mãe de coração “Têre” (*in memoriam*), que se faz presente em todos os dias da minha vida, sei que de seu lugar olha por mim, sofre com minhas derrotas e rejubila com minhas vitórias...

...DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, onde sempre encontrei apoio, carinho e incentivo para superar desafios e alcançar meus objetivos. Certamente se não fosse por eles, eu não teria tido essa oportunidade.

A minha mãe, Célia Fossa, pelo amor, carinho e por sempre ter feito tudo para me proporcionar as melhores oportunidades.

Em especial aos meus tios, Ari Dal Piva e Cida Fossa, que me acolheram como filho e nunca mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Eu posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem vocês.

Ao meu orientador Emerson Medeiros Del Ponte, pela dedicação na orientação, por me forçar a melhorar sempre, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao professor Gary Carlton Bergstrom, pelo acolhimento, suporte e incentivos no período em Ithaca, um dos exemplos de profissional e de pessoa que levo comigo.

Ao professor Ricardo Trezzi Casa, por ser o responsável por despertar o meu interesse pela Fitopatologia, a quem eu admiro pela dedicação e sabedoria, além de ter sido um verdadeiro amigo ao longo desses anos de convivência e ensinamentos.

Ao doutor Todd Ward, pela identificação das espécies filogenéticas e genótipos tricocenos dos isolados oriundos de peritécios em colmos de milho.

Aos bolsistas de iniciação científica, Daniel Darde e Bruna Bittencourt, pela amizade, dedicação e cooperação na condução dos experimentos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Epidemiologia da UFRGS, André Schwanck, Camila Nicolli, Felipe Dalla Lana, Larissa Gomes e Leilane Silveira, pela amizade.

Aos alunos e funcionários do laboratório do Prof. Bergstrom, pela compreensão e auxílio na condução dos experimentos em Cornell.

Ao meu grande amigo, Pierri Spolti, obrigado pela amizade e companheirismo, pelas ajudas, contribuições e conversas, que como ele mesmo diz, não ficaram restritas a Fitopatologia.

A todos os meus amigos, pela força, amizade, ajuda e compreensão pelas diversas vezes que estive ausente ao longo destes quatro anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiar e viabilizar o meu doutorado na UFRGS e período sanduiche na *Cornell University*.

COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium graminearum* EM MILHO E TRIGO: ASPÉCTOS ECOLÓGICOS, PATOGÊNICOS E TOXIGÊNCIOS DE ISOLADOS DO SUL DO BRASIL E NORDESTE DOS ESTADOS UNIDOS¹

Autor: Paulo Roberto Kuhnem Junior
Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte

RESUMO

A giberela em trigo e milho é causada por diferentes membros do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC) que apresentam-se com variado perfil toxigênico para produção de tricotecenos. São escassos estudos epidemiológicos que visam identificar e determinar a frequência de espécies e quimiotipos do FGSC em diferentes fases do seu ciclo de vida. Num primeiro estudo, conduzido no Rio Grande do Sul (RS), 295 isolados monospóricos de FGSC foram recuperados de peritécios de colmos de milho em decomposição em 15 lavouras no norte do RS. Por meio de genotipagem multilocus, *F. meridionale* (Fmer) (155/295) foi a espécie predominante, seguido por *F. graminearum* (Fgra) (83/295) e *F. cortaderiae* (Fcor) (57/295). Todos os isolados Fmer foram identificados como tendo o genótipo tricoteceno nivalenol (NIV) (FmerNIV), enquanto que todos Fgra apresentaram o genótipo 15-acetildeoxinivalenol (ADON) (Fgra15A). A espécie Fcor apresentou isolados com os genótipos 3-ADON (Fcor3A) e NIV (FcorNIV). A espécie Fmer foi observada em todas as áreas amostradas. Fgra15A foi observada em maior frequência nas regiões classificadas com altitude <800m, enquanto Fcor nas regiões de altitude >800m. Num segundo estudo, foi determinada a frequência dos genótipos tricotecenos de 1.407 isolados de *F. graminearum* oriundos de diferentes habitats (restos culturais de milho, ar e espigas de milho e de trigo) em três diferentes agroecossistemas em Nova York, Estados Unidos. As análises moleculares baseadas nos genes *Tri3* e *Tri12* mostraram que, o genótipo 15-ADON foi o dominante (83%), seguido do genótipo 3-ADON (17%). O genótipo NIV não foi detectado. As populações locais de *F. graminearum* parecem não ser estruturadas pelos habitats analisados, incluindo as fases patogênicas e saprofíticas do ciclo de vida do fungo. Populações regionais do patógeno separados por menos de 400 km diferiram significativamente na frequência do genótipo tricoteceno. Num terceiro estudo, dezesseis isolados de Fgra oriundos de espigas de milho e trigo de Nova York, apresentando genótipo 3-ADON e 15-ADON, foram caracterizados quanto a agressividade e potencial toxigênico quando inoculados em espigas de milho e de trigo. A variação na agressividade e produção de micotoxinas dos isolados de *F. graminearum* em plantas de trigo e milho não permitiu a separação dos isolados em grupos, nem pelo hospedeiro de origem, nem pelo genótipo tricoteceno.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia/Fitopatologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (79p.) Dezembro, 2014.

***Fusarium graminearum* SPECIES COMPLEX IN WHEAT AND MAIZE:
ECOLOGY ASPECTS, AGGRESSIVENESS AND TOXIGENICITY OF
ISOLATES FROM SOUTH BRAZIL AND NORTHEASTERN UNITED
STATES²**

Author: Paulo Roberto Kuhnem Junior
Advisor: Emerson Medeiros Del Ponte

ABSTRACT

Fusarium head blight (FHB) in wheat and *Gibberella* ear rot (GER) in maize are caused by members of the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC). There are limited epidemiological studies aimed at determining the frequency of FGSC species and trichothecene genotypes at different stages of the pathogen life cycle. In the first study conducted in Brazil, 295 single spore isolates of *F. graminearum* sensu lato have been recovered from maize stubble showing perithecia in 15 fields in Rio Grande do Sul state. Multilocus genotyping assay showed that *F. meridionale* (Fmer) (155/295) was the predominant species, followed by *F. graminearum* (Fgra) (83/295), and *F. cortaderiae* (Fcor) (57/295). All Fmer isolates were of the nivalenol (NIV) trichothecene genotype (FmerNIV), while all Fgra were of the 15-acetyldeoxynivalenol (ADON) genotype (Fgra15A). The Fcor species showed isolates with either 3-ADON (Fcor3A) or NIV (FcorNIV) genotypes. Fmer isolates were observed in all sampled areas. Fgra15A was observed more frequently in regions classified as lower elevation (<800m), while Fcor in regions of higher elevation (>800m). In the second study, the frequency of trichothecene genotypes were determined in a collection of Fgra isolates obtained from different habitats (maize stubble, air, ears of maize and wheat) across three different agroecosystems in New York. In total, 1,407 Fgra isolates were isolated and had their trichothecene genotype identified. Molecular analysis based on *Tri3* and *Tri12* genes showed that 15-ADON genotype was the dominant (83%) followed by 3-ADON genotype (17%). The NIV genotype was not detected. As viewed by the composition of trichothecene genotypes, local populations of *F. graminearum* appear not to be structured by these four habitats inclusive of pathogenic and saprophytic phases of the fungus life cycle. Regional populations of the pathogen separated by less than 400 km differed significantly in trichothecene genotype frequency. The third study, aimed to assess whether Fgra isolates are more fit pathogenically or produce higher amounts of mycotoxins when causing the disease in their host of origin, and to compare the aggressiveness and trichothecene production of 3-ADON and 15-ADON genotypes chemotypes isolated from symptomatic wheat heads and maize ears. Fgra isolates from New York showed wide variation in aggressiveness and mycotoxin production towards susceptible wheat and maize. However, neither host of origin nor trichothecene chemotype appeared to structure the populations from the studied region.

² Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (79p.) December, 2014.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Giberela em trigo e milho.....	5
2.2 Taxonomia de <i>Fusarium graminearum</i>	8
2.3 Distribuição geográfica do FGSC.....	10
2.4 Genótipo tricoteceno e quimiotipo.....	11
2.5 Distribuição geográfica de genótipos tricotecenos.....	12
2.6 Papel dos tricotecenos na patogenicidade e na agressividade.....	13
2.7. Ciclo biológico e ecologia de <i>Fusarium graminearum</i>	15
2.8. Manejo da giberela em milho e trigo.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Estudo 1: Diversidade de espécies em restos culturais de milho.....	19
3.1.1 Área de estudo e amostragem.....	19
3.1.2 Isolamento, purificação e caracterização morfológica	20
3.1.3 Produção de micélio e extração de DNA.....	21
3.1.4 Determinação das espécies e genótipos tricotecenos..	21
3.1.5 Taxa de crescimento micelial em duas temperaturas..	22
3.2 Estudo 2: Genótipos tricotecenos de <i>Fusarium</i> <i>graminearum</i> em diferentes habitats em três agroecossistemas de Nova York.....	23
3.2.1 Área e habitats amostrados.....	23
3.2.2 Amostragem e procedimentos de isolamento.....	23
3.2.3 Extração de DNA e teste de PCR.....	26
3.2.4 Análise de dados.....	27
3.3 Estudo 3: Agressividade e perfil toxigênico de <i>Fusarium</i> <i>graminearum</i> de milho e trigo inoculados em ambos hospedeiros.....	27
3.3.1 Coleção de isolados e testes de patogenicidade.....	27
3.3.2 Agressividade e produção de micotoxinas em espigas de trigo.....	29
3.3.3 Agressividade e produção de micotoxinas em espigas de milho.....	31
3.3.4 Tombamento de plântulas de milho.....	32
3.3.5 Análises estatísticas.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

	Página
4.1 Estudo 1: Diversidade de espécies em restos culturais de milho.....	35
4.1.1 Resultados.....	35
4.1.2 Discussão.....	39
4.2 Estudo 2: Genótipos tricotecenos de <i>Fusarium graminearum</i> em diferentes habitats em três agroecossistemas de Nova York.....	43
4.2.1 Resultados.....	43
4.2.2 Discussão.....	46
4.3 Estudo 3: Agressividade e perfil toxigênico de <i>Fusarium graminearum</i> de milho e trigo inoculados em ambos hospedeiros.....	51
4.3.1 Resultados.....	51
4.3.2 Discussão.....	58
5. CONCLUSÕES.....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Informação dos 16 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> avaliados quanto agressividade no campo (espigas de milho) e casa de vegetação (sementes de milho e espigas de trigo) em Ithaca, NY, 2013.....	28
2. Informações e identificação de isolados do complexo <i>Fusarium graminearum</i> obtidos de peritécios em colmos de milho em decomposição com base em genotipagem multiloco.....	36

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Sintomas de giberela em trigo (A) e podridão de giberela em espiga (B) e colmo (C) de milho causadas por <i>Fusarium graminearum</i> sensu lato. Figura B e C é cortesia de Gary C. Bergstrom.....	7
2. Detalhe de peritécios de <i>Fusarium graminearum</i> sobre colmo de milho em decomposição.	16
3. Localização geográfica de 15 áreas agrícolas (pontos) em cinco regiões no norte do Estado do Rio grande do Sul onde foram feitas coletas de colmos de milho em decomposição da safra anterior com sinais (peritécios) de <i>F. graminearum</i> . SB=Santa Bárbara; PF=Passo Fundo; LV=Lagoa Vermelha; VC=Vacaria e BJ=Bom Jesus.....	20
4. Coletor de esporos contendo placa de Petri com meio semi-seletivo para <i>Fusarium</i> (A e B), colônias candidatas de <i>Fusarium graminearum</i> em meio de Nash-Snyder após 5 dias de incubação (C) e colônia monospórica de <i>Fusarium graminearum</i> em meio de batata-dextrose-ágar (D).....	25
5. Sementes de trigo gibereladas em meio de cultura de batata-dextrose-ágar após 6 dias de incubação apresentando colônias típicas de <i>Fusarium graminearum</i>	26
6. Inoculação de <i>Fusarium graminearum</i> pelo método de flor única em espigas de trigo (A), espigas cobertas com saco plástico e mantidas cobertas por 48 h após a inoculação com temperatura de 25 °C e com ciclo de 14 h de luminosidade (B) e espigas mostrando sintomas de giberela 10 dias após a inoculação.....	30
7. Inoculação de <i>Fusarium graminearum</i> em espigas de milho aos três dias após a exteriorização dos estigmas (A) e espiga de milho mostrando sintomas de podridão de giberela nove semanas após a inoculação (B).....	32

	Página
8. Sintoma de tombamento de plântula de milho (A), plântula e raiz necrosadas (B) e plântula e raiz sadias (C).....	34
9. Frequência de três espécies, e seus respectivos genótipos tricotecenos, do complexo <i>Fusarium graminearum</i> identificadas em uma coleção de 295 isolados obtidos de peritécios presentes em colmos de milho em decomposição amostrados aleatoriamente em cada uma das 15 áreas localizadas em cinco regiões (SB = Santa Bárbara; PF = Passo Fundo; LV = Lagoa Vermelha; VC = Vacaria; BJ = Bom Jesus) no norte do Estado do Rio grande do Sul).....	37
10. Taxa de crescimento micelial (mm/dia) nas temperaturas de 15 e 25 °C para 60 isolados do complexo <i>Fusarium graminearum</i> , sendo 15 isolados <i>F. graminearum</i> (Fgra15A), 15 isolados <i>F. cortaderiae</i> (Fcor) genótipo 3-ADON (Fcor3A) e 15 isolados genótipo NIV (FcorNIV), e 15 isolados <i>F. meridionale</i> (FmerNIV).....	38
11. Uso da terra no Estado de Nova York e frequência relativa dos dois genótipos tricotecenos (3-ADON e 15-ADON) de <i>Fusarium graminearum</i> . Círculo representa o total de isolados (N) coletados em cada localidade/ano. Fonte: CropScape – Cropland data layer (NASS/USDA).....	44
12. Genótipos tricotecenos de <i>Fusarium graminearum</i> isolados de colmos de milho, ar, grãos de trigo e de milho em três agroecossistemas em Nova York. Resultados estão expressos em porcentagem relativo ao total de isolados por habitat (N).....	45
13. Severidade de giberela em trigo (A), de podridão de giberela em milho (B), e incidência de tombamento de plântulas de milho (C) causadas por 16 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> oriundos de espigas de trigo ou milho e do genótipo 3-acetyl(A)deoxivalenol(DON) ou 15-ADON.....	52
14. Produção de DON, formas acetiladas e ZEA em grão de trigo (A) e grãos de milho (B) de 16 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> oriundos de espigas de trigo ou milho e do genótipo 3-acetyl(A)deoxivalenol(DON) ou 15-ADON.....	53

	Página
15. Gel de agarose 1% mostrando os amplicons dos genes <i>Tri3</i> (acima) e <i>Tri12</i> (abaixo) dos genótipos tricotecenos dos 16 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> . Para <i>Tri3</i> , produtos da PCR apresentam tamanho de 610 e 243 pb para os genótipos 15-ADON e 3-ADON, respectivamente. Para <i>Tri12</i> , produtos da PCR apresentam tamanho de 670 and 410 pb para os genótipos 15-ADON e 3-ADON, respectivamente. Representantes dos genótipos 15-ADON (linhas 1–9) e 3-ADON (linhas 10–16). Marcadores com tamanho de 100 pb.....	54
16. Correlação entre tricotecenos total e severidade de giberela em trigo (pontos pretos) e milho (pontos brancos).....	55
17. Características patogênicas de 16 isolados de <i>Fusarium graminearum</i> oriundos de espigas de trigo ou milho e do genótipo 3-acetyl(A)deoxivalenol(DON) ou 15-ADON. Redução da emergência (A), incidência de tombamento de plântulas (B), redução do comprimento de parte aérea (C), de raiz (D), de peso de parte aérea (E), e peso de raiz (F) aos 14 dias após o semeadura.....	57

1 INTRODUÇÃO

O milho e trigo têm posição de destaque dentre os cultivos de cereais por constituírem a alimentação básica de humanos e animais. São cultivados nas mais diversas condições edafoclimáticas, o que os tornam vulneráveis em algumas situações aos fatores limitantes à expressão do potencial produtivo, dentre esses a ocorrência de doenças, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical.

A morfoespécie *Fusarium graminearum* é um dos principais patógenos desses cereais no mundo, causando doenças diversas como podridões de giberela na espiga e no colmo do milho e a giberela em espigas de trigo. Quando ocorre nas espigas, o fungo pode reduzir o rendimento de grãos e contaminar os grãos com micotoxinas, especialmente os tricotecenos deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV). A presença de micotoxinas torna os grãos inaceitáveis para consumo humano ou para ração animal, uma vez que podem causar vômitos, recusa alimentar e diminuição de ganho de peso em suínos e aves e, ainda, ter efeitos teratogênicos e carcinogênicos. Como medida de controle, muitos países têm promulgado limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em grãos e subprodutos para consumo humano e animal. No Brasil, apenas em 2011 foi implementado o LMT de algumas micotoxinas para milho e trigo. A partir de 2014, foi estabelecido o LMT de 3 ppm de DON em grãos de milho e trigo.

Por muitos anos *F. graminearum sensu lato* era considerada uma única espécie cosmopolita. No entanto, com base no reconhecimento de espécie filogenética com concordância genealógica, estudos recentes identificaram pelo menos 15 espécies descritas formalmente no complexo de espécies *F. graminearum* (FGSC = *F. graminearum species complex*). Dentre essas, a mais amplamente disseminada nas regiões produtoras de trigo do mundo foi denominada *F. graminearum sensu stricto* (ou simplesmente *F. graminearum*). Isolados FGSC tem sido caracterizados, por meio de análises químicas, quanto ao tipo e quantidade de tricotecenos do tipo B produzido, que permite classificar um isolado em um determinado quimiotipo (fenótipo químico). Os três quimiotipos mais comumente determinados são aqueles que produzem, na grande maioria dos casos, primariamente DON e 3-ADON, primariamente DON e 15-ADON e primariamente NIV e acetilados, por convenção denominados 3-ADON, 15-ADON e NIV, respectivamente. Para superar as desvantagens da análise química como o alto custo em grande número de amostras, métodos moleculares com base na PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram desenvolvidos para prever o quimiotipo - no caso específico o método permite determinar o genótipo tricoteceno e não o quimiotipo, que é determinado por análise química. Os diferentes protocolos PCR tem permitido identificar e mapear os genótipos tricotecenos em coleções de isolados FGSC ao redor do mundo.

No Brasil, estudos com isolados FGSC no trigo mostraram que há pelo menos cinco membros do complexo (*F. asiaticun*, *F. austroamericanum*, *F. graminearum*, *F. meridionale*) presentes no sul do Brasil, os quais, em sua maioria apresentam apenas um determinado genótipo tricoteceno. A espécie dominante em trigo, *F. graminearum*, apresenta de maneira consistente o genótipo 15-ADON, enquanto que a segunda em dominância, *F. meridionale* apresenta apenas o genótipo NIV. Espécies que segregam

para mais de um genótipo tricoteceno (3-ADON ou NIV) são *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum*. Estudos de levantamento dos genótipos tricotecenos em grãos de milho no Brasil tem sido escassos, porém tem sido observado predomínio do genótipo NIV em relação ao 15-ADON. Já nos Estados Unidos ocorre apenas uma espécie do complexo em trigo e milho, *F. graminearum*, segregando para 15-ADON, 3-ADON e NIV, nesta ordem de frequência.

A principal fonte de inóculo de FGSC para infecções nos órgãos florais são os restos culturais de milho e trigo onde são formados os peritécios. Assim, práticas culturais podem influenciar na dinâmica e na estrutura populacional das espécies do complexo, seja pelo aumento do inóculo pelo maior acúmulo de resíduos em monocultura ou pela manutenção prolongada dos resíduos em sistema de plantio direto. Além disto, sistemas de cultivo dominados por uma única cultura (monocultura) facilitam a maior dispersão do inóculo do patógeno.

A frequência de espécies e genótipos toxigênicos em populações do complexo *F. graminearum*, têm sido avaliadas, na cultura do milho, primariamente em isolados obtidos de podridões da espiga. São raros os estudos populacionais com isolados obtidos de diferentes fases do ciclo de vida do patógeno, tal como a fase saprofítica. Além disto, populações patogênicas de *F. graminearum* causando giberela em trigo são mais estudadas e mais bem caracterizadas em relação à frequência de espécies e características de agressividade e produção de micotoxinas comparado às populações em milho.

As hipóteses testadas nesta tese são: i) diferentes espécies e genótipos tricotecenos do complexo *F. graminearum* sobrevivem (formando peritécios) em colmos de milho com variada frequência em função da região do RS, Brasil; ii) nos Estados Unidos a composição de genótipos tricotecenos em *F. graminearum* varia

conforme o hospedeiro e habitat (espigas, ambiente aéreo e restos culturais); e iii) isolados de *F. graminearum* originados do milho ou trigo são mais aptos a causar doença e produzir micotoxinas no seu hospedeiro de origem.

A tese está organizada em três estudos. O primeiro foi baseado em um levantamento de isolados de *F. graminearum* oriundos de peritécios em colmos de milho em fase de decomposição no período de entressafra em diferentes regiões produtoras de milho do estado do Rio Grande do Sul, cujos objetivos foram i) determinar a frequência das espécies e genótipos tricotecenos de *F. graminearum* em sua fase saprofítica e; ii) identificar diferenças na composição destas espécies/genótipos de acordo com a região amostrada. O segundo e terceiro estudo foram conduzidos durante o período de doutorado sanduíche na *Cornell University*, Estados Unidos, que objetivaram: i) avaliar a frequência dos genótipos tricotecenos em diferentes fases do ciclo biológico de *F. graminearum* e; ii) avaliar a distribuição destes genótipos em diferentes regiões do estado de Nova York. Finalmente, o terceiro estudo teve por objetivos: i) avaliar se os isolados são mais agressivos ou toxigênicos quando inoculados em seus hospedeiros de origem e; (ii) comparar a agressividade e o potencial toxigênico de isolados 3-ADON e 15-ADON em espigas de trigo e milho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Giberela em trigo e milho

O cultivo de cereais no Brasil tem destaque importante no cenário da produção agrícola nacional. Dentre esses, o milho (*Zea mays* L.) é responsável por, aproximadamente, 80 milhões de toneladas, o que representa 37% da produção nacional total de grãos (Conab, 2014). Na região sul do Brasil, o milho é um dos principais cultivos da safra de verão. Por sua vez, o trigo (*Triticum aestivum* L.) é o cereal mais cultivado na safra de inverno nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná com produção ao redor de cinco milhões de toneladas, a qual atende em torno de 50% da demanda industrial do Brasil (Conab, 2014). No país esses dois cereais são utilizados, principalmente, como alimento básico para a ração animal e na alimentação humana, sendo o milho ainda utilizado para produção de etanol em alguns países (Embrapa, 2009).

Ambas as culturas sofrem o ataque de diversas doenças fúngicas em diferentes partes da planta (Wiese, 1977; White, 1999). Dentre as doenças de espiga, destacam-se as causadas por espécies do gênero *Fusarium*. No milho, *F. graminearum* sensu lato é a espécie comumente encontrada colonizando os grãos (Munkvold & Desjardins, 1997), embora outras espécies também estejam associadas, como *F. culmorum* na Europa

(Logrieco *et al.*, 2002; Scauflaire *et al.*, 2011). No trigo, diversas espécies foram identificadas causando sintomas de giberela incluindo-se *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. equiseti* e *Microdochium nivale* (Starkey *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2009).

Dentre as doenças causadas por *F. graminearum* sensu lato destacam-se, em milho, a podridão da espiga e do colmo de giberela (Reid *et al.*, 1999; Munkvold, 2003) e, em trigo, a giberela em espigas (McMullen *et al.*, 2012). Infecções por *F. graminearum* sensu lato nestes cereais podem reduzir a produtividade e a qualidade do cereal pela contaminação dos grãos por micotoxinas, especialmente da classe dos tricotecenos-B (Miller *et al.*, 1991; Munkvold, 2003; Desjardins *et al.*, 2008). Os tricotecenos produzidos por *F. graminearum*, além de serem considerados fator de virulência (Bai *et al.*, 2002; Harris & Desjardins, 1999), apresentam um risco na alimentação animal e humana, pois têm ação de inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas em células eucarióticas, ação imunossupressora (Rocha *et al.*, 2005) e efeitos carcinogênicos em animais e humanos (Bryden, 2007; Schmale & Munkvold, 2009).

Os sintomas no trigo se caracterizam pela despigmentação de aristas e espiguetas, que adquirem coloração esbranquiçada e aristas arrepiadas (Figura 1A). Em anos de epidemias severas com condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento desse fungo, pode-se visualizar sobre as espiguetas o crescimento da frutificação do fungo de coloração rosa-alaranjada (Wiese, 1977; White, 1999).

No milho, os sintomas nas espigas são manifestados pela presença de um mofo rosa-vermelhado, com início de formação na extremidade da espiga, evoluindo em direção à sua base, sendo que os grãos colonizados localizam-se, na maioria das vezes, na ponta da espiga. Quando os sintomas têm início a partir de uma infecção favorecida por ferimento, eles evoluem do centro da lesão em sentido radial. Quando a infecção

ocorre no florescimento, a podridão pode ocorrer em toda a espiga (Figura 1B) (White, 1999; Reid *et al.*, 1999; Casa *et al.*, 2010). Na cultura do milho, esse patógeno causa a podridão do colmo de giberela, frequentemente relatada em levantamentos de podridão do colmo no sul do Brasil. Um sintoma típico da giberela e que a diferencia de outras podridões é a coloração rosa avermelhada (Figura 1C) que surge nos tecidos internos do colmo (Reis *et al.*, 2004), em função da colonização do patógeno em plantas, com colmos ainda verdes ou em maturação próximas à colheita. Na superfície dos tecidos sintomáticos pode-se observar também a presença de peritécios, que são pontuações negras esféricas e visíveis a olho nu (Sutton, 1982; White, 1999).



FIGURA 1. Sintomas de giberela em trigo (A) e podridão de giberela em espiga (B) e colmo (C) de milho causadas por *Fusarium graminearum* sensu lato. Figura B e C é cortesia de Gary C. Bergstrom.

2.2 Taxonomia de *Fusarium graminearum*

Até 1999 a espécie morfológica *F. graminearum* era dividida em dois grupos, sendo a atual espécie *F. graminearum* sensu lato caracterizada como pertencente ao grupo ecológico II (Francis & Burgess, 1977). Morfologicamente, de difícil diferenciação com o Grupo I, mas com importantes diferenças ecológicas e patológicas. Aoki & O'Donnell (1999) descreveram o grupo I como uma população de *F. pseudograminearum* e com o Grupo II a população que manteve o nome original *F. graminearum*. Sendo a principal diferença entre os grupos que *F. graminearum* é homotático e forma peritécios e *F. pseudograminearum* é heterotático e dificilmente forma peritécio em condições naturais, além de ter o crescimento micelial mais lento do que o primeiro.

As características morfológicas de *F. graminearum* destacam-se pela presença de macroconídios, sendo os esporodóquios muitas vezes escassos, mas, quando presentes, são de cor laranja e posicionados sobre o micélio. A formação de clamidósporos é variável entre os isolados e os microconídios estão ausentes (Leslie & Summerell, 2006). As colônias de *F. graminearum* usualmente apresentam micélio cotonoso com coloração que pode variar entre o branco e o rosa. Os macroconídios são hialinos, fusiformes, usualmente divididos por septos, em número de cinco. Por muito tempo a duplicidade de nomes foi utilizada na taxonomia de fungos, sendo a forma perfeita, sexuada, ou teleomórfica de *F. graminearum* conhecida como *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch. Em 2013, o comitê internacional de nomenclatura de algas, fungos e plantas sugeriu o uso de apenas um nome científico (*One Fungus One Name*), sendo o nome *F. graminearum* o adotado pela comunidade científica internacional (Geiser *et al.*, 2013).

Com o advento da biologia molecular, os estudos de filogenia, taxonomia de fitopatógenos, bem como a elucidação dos mecanismos que regulam a síntese de micotoxinas, passaram a ser fundamentadas em análises de DNA, as quais permitem diferenciar entre dois ou mais indivíduos, e são herdadas geneticamente (Nayaka *et al.*, 2011). A técnica molecular mais simples de uso corriqueiro em laboratório tem sido a PCR, permitindo amplificação de um fragmento específico do genoma do patógeno. Esta técnica apresenta um alto grau de confiabilidade e possibilita a diferenciação ao nível de espécies, empregando-se ‘primers’ (oligonucleotídeos iniciadores específicos), sendo que os produtos da amplificação podem ser diferenciados pelo tamanho do fragmento genômico ou seqüência de nucleotídeos (Yli-Mattila *et al.*, 2009).

Várias regiões dos genes têm sido frequentemente empregadas para estudos filogenéticos sobre o gênero *Fusarium*, por exemplo, as porções dos genes fator de alongação 1-alfa (EF-1 α) (O'Donnell *et al.*, 2010). O uso desta região pode ser atribuído ao seu alto grau de informação ao nível de espécie, e ao fato de não ter sido relatado a ocorrência de cópias não ortólogas, bem como pela disponibilidade de ‘primers’ universais baseadas nesse gene (Geiser *et al.*, 2004). Assim, pela possibilidade da amplificação de DNA pela técnica de PCR e a facilidade no sequenciamento de pequenos fragmentos de DNA e até genomas inteiros, diversos ‘primers’, que amplificam fragmentos específicos de interesse no DNA, foram desenvolvidos (Gale *et al.*, 2005). Até o presente momento, analisando através da genotipagem multilocus (MLGT) (O'Donnell *et al.*, 2008), foram determinadas pelo menos 15 espécies filogeneticamente distintas no clado *F. graminearum*, comumente denominadas como membros do complexo de espécies *F. graminearum* (FGSC, *Fusarium graminearum* species complex) (Starkey *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2009; Sarver *et al.*, 2011).

2.3 Distribuição geográfica do FGSC

Fusarium graminearum sensu lato é considerada uma espécie cosmopolita com base em conceitos biológicos e morfológicos (Leslie & Summerell, 2006). No entanto, reconhecendo-se as espécies filogenéticas do complexo, aquela mais disseminada em todas as regiões produtoras foi denominada *F. graminearum* sensu stricto (ou simplesmente *F. graminearum*), também definida como linhagem 7 (O'Donnell *et al.*, 2000, 2004). Além dessa, outras espécies têm sido encontradas em estudos de levantamento em frequência similar ou mesmo maior que *F. graminearum*, dependendo do hospedeiro e da região geográfica.

Na Argentina, Sampietro *et al.* (2011), estudando a diversidade e o potencial toxigênico de FGSC em grãos de milho, identificaram como predominante a espécie *F. meridionale*, seguida de *F. boothii*. No Nepal, foram identificadas as espécies *F. asiaticum*, *F. meridionale* e *F. boothii*, além de uma nova espécie (linhagem nepalense) em milho produzido em pequenas propriedades do alto da montanha do Himalaia (Desjardins & Proctor, 2011). Na África do Sul, em diferentes hospedeiros, foi observado a predominância de *F. boothii* em 100% de isolados de grãos de milho, no entanto, para podridão de raiz, *F. graminearum* foi a predominante (75%), sendo estes valores próximos aos observados em grãos de trigo e cevada (85%) (Boutigny *et al.*, 2011).

Na América do Sul, estudos de caracterização de espécies filogenéticas em trigo na Argentina, Brasil e no Uruguai, mostraram o predomínio da espécie *F. graminearum* (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2011; Reynoso *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2015). No Brasil, uma grande diversidade de espécies filogenéticas do FGSC foi relatada em estudos de identificação dos isolados associados com outros hospedeiros de importância econômica. Além de *F. graminearum*, também foram identificadas as

espécies *F. austroamericano*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. asiaticum* associadas com as culturas do arroz, cevada, soja e trigo (Martinelli *et al.*, 2004; Astolfi *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2014). Em uma coleção de isolados de grãos de arroz, coletados no estado do Rio Grande do Sul, *F. asiaticum* foi a espécie predominante (85%) (Gomes *et al.*, 2014). Diferentemente da América do Sul, *F. asiaticum* é a espécie predominante em levantamentos de grão de trigo em países asiáticos como China e Coreia do Sul (Suga *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

2.4 Genótipo tricoteceno e quimiotipo

Além da diversidade genética que sugere a separação de espécies filogenética do complexo, há variabilidade nas populações em relação ao tricoteceno que é produzido por um determinado isolado, o seu fenótipo químico, comumente denominado de quimiotipo. A utilização de métodos moleculares de amplificação de DNA por PCR (Doohan *et al.*, 1999) para determinar o genótipo tricoteceno de espécies de *F. graminearum* como forma de prever o quimiotipo, tem contribuído para o conhecimento e a determinação da distribuição da população de diferentes quimiotipos pelo mundo (Desjardins, 2008). Esta predição se dá pela expressão do cluster gênico *Tri* (Kimura *et al.*, 2003), responsável por mais de 50% da expressão da rota metabólica dos tricotecenos (Desjardins & Proctor, 2007). Nesse sentido, utilizando-se *primers* que amplificam porções dos genes preditivos da síntese de DON (e suas formas acetiladas) ou NIV, são preditivos do quimiotipo (Lee *et al.*, 2001; Nicholson *et al.*, 2003). Ainda, em uma única reação em cadeia de polimerase (multiplex-PCR) pode-se detectar os três genótipos tricotecenos a partir da amplificação de porções das sequências *Tri3*, *Tri5*, *Tri7*, *Tri12* e *Tri13* (Desjardins &

Proctor, 2011; Wang *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2002). Os genótipos e quimiotipos tricotecenos mais comuns são o 3-ADON e o 15-ADON, os quais produzem primariamente deoxinivalenol e um dos acetilados (3-acetil(A)deoxinivalenol(DON) ou 15-ADON) e o nivalenol (NIV), o qual produz primariamente NIV e acetilados (Miller *et al.*, 1991).

2.5 Distribuição geográfica de genótipos tricotecenos

A relação entre a espécie filogenética e o seu quimiotipo é variável entre as regiões, onde pode ocorrer ou não uma segregação para mais de um quimiotipo. Nos Estados Unidos e no Canadá, isolados da espécie filogenética predominante, *F. graminearum*, segrega para 3-ADON, 15-ADON ou NIV (Gale *et al.*, 2011; Schmale *et al.*, 2011). Já na Ásia, a mesma espécie apresenta somente os genótipos 3-ADON ou 15-ADON (Zhang *et al.*, 2010). Na Argentina, a população dessa espécie é predominantemente 15-ADON (Reynoso *et al.*, 2011). Na África do Sul, em estudo de 386 isolados, todos os isolados classificados como *F. graminearum* foram determinados como 15-ADON, com exceção de dois isolados do tipo 3-ADON. Já os isolados *F. boothii* apresentaram o tipo 15-ADON, enquanto que o genótipo NIV foi detectado em isolados das espécies *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. acaciae-mearnsii* (Boutigny *et al.*, 2011). No Brasil, há indícios de que as espécies sejam estruturadas de acordo com o genótipo tricoteceno. Por exemplo, todos os isolados oriundos de grãos de trigo e cevada classificados como *F. meridionale* foram do genótipo NIV, enquanto que para *F. graminearum* foram do genótipo 15-ADON, sendo este último o quimiotipo predominante (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2015). Em estudo de levantamento de isolados obtidos de grãos de milho, Silva (2011) observou predomínio do tipo NIV em relação ao 15-ADON, mas com

ausência dos isolados do tipo 3-ADON. No entanto esse autor não realizou a identificação das espécies filogenéticas envolvidas

2.6 Papel dos tricotecenos na patogenicidade e na agressividade

A biossíntese de metabolitos secundários, incluindo os tricotecenos, provavelmente representa um custo metabólico para o fungo (Desjardins & Proctor, 2007). No entanto, os tricotecenos, assim como outras micotoxinas, podem estar relacionada com as competições com outros fungos, bem como influenciar nas interações entre fungos e plantas (Xu & Nicholson, 2009).

Estudos tem demonstrado que DON não é necessário para a patogenicidade, mas atua como um fator de virulência em trigo (Jansen *et al.*, 2005) e milho (Harris & Desjardins, 1999). Em experimentos de campo, isolados mutantes com o gene *Tri5* inativado, o gene que codifica a trichodiene sintase, causaram menos doença em espigas de trigo que os isolados selvagens, sem o gene inativado para a produção de tricotecenos (Desjardins *et al.*, 1996). Mesmos resultados foram observados em milho, onde isolados como o gene *Tri5* inativado causaram menor severidade em espigas de milho do que o isolado selvagem ou o isolado com gene reativado (Harris & Desjardins, 1999). Porém tem sido relatado que NIV, em contraste com DON, funciona como um fator de agressividade na podridão de giberela em milho (Maier *et al.*, 2006).

As diferenças na agressividade e potencial toxigênico entre diferentes genótipos tricotecenos têm sido objeto de estudo por vários autores e os resultados tem sido inconsistentes e dependem da característica avaliada (Ohe *et al.*, 2010; Puri & Zhong, 2010; Gilbert *et al.*, 2014; Spolti *et al.*, 2014a). Por exemplo, no trigo, a agressividade é mais comumente avaliada em casa de vegetação com inoculação da espiguetta central (Cumagun & Miedaner, 2004; Spolti *et al.*, 2014a). No milho, a podridão de giberela é

avaliada através do canal do estigma em campo e em condições controladas (Harris & Desjardins, 1999; Miedaner *et al.*, 2010). Sementes dessas duas culturas são inoculadas e germinação, emergência e transmissão do fungo são avaliados (Munkvold & O'Mara, 2002; Wu *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2013a). Ainda existem trabalhos que utilizam ensaios *in vitro* de crescimento micelial, esporulação e produção de peritécios para caracterizar a agressividade de diferentes isolados (Purahong *et al.*, 2011, 2014; Spolti *et al.*, 2014a).

O perfil toxigênico de isolados tem sido relacionada com o *fitness* patogênico. Estudos com isolados de *F. graminearum* de algumas regiões dos EUA e Canadá mostraram que isolados 3-ADON foram mais agressivos em espigas de trigo que isolados 15-ADON (Puri & Zhong, 2010; Foroud *et al.*, 2012). No entanto, isolados 3-ADON não apresentaram nenhuma vantagem no *fitness* em relação a isolados 15-ADON, em uma larga coleção (50 isolados) de *F. graminearum* isolados de espigas de trigo em New York (Spolti *et al.*, 2014a). Da mesma forma, isolados de *F. graminearum* inoculados em espigas de linhagens de milho mostraram variação na severidade de doença na espiga e não puderam ser discriminados pelo quimiotipo (Miedaner *et al.*, 2010). Desta forma, com relação ao tipo de tricoteceno (DON e NIV), tem-se sugerido que a predominância de DON em grãos de cereais pode ser devida a uma vantagem seletiva para a infecção de cereais, particularmente trigo, enquanto isolados produtores de NIV apresentem vantagem na colonização de milho (Ward *et al.*, 2002; Maier *et al.*, 2006; Xu & Nicholson, 2009). No Brasil, foram observadas diferenças na agressividade das espécies *F. graminearum*, do genótipo 15-ADON, e *F. meridionale*, do genótipo NIV, em trigo (Spolti *et al.*, 2012) e milho (Kuhnem Júnior *et al.*, 2013), reforçando a hipótese que a preferência por hospedeiro entre as espécies do FGSC está relacionada a diferenças na habilidade competitiva na infecção e

colonização do hospedeiro (Boutigny *et al.*, 2011), talvez influenciada pelo tipo do tricoteceno produzido.

2.7 Ciclo biológico e ecologia de *Fusarium graminearum*

Os grãos de milho infectados pelas espécies do complexo *F. graminearum* e contaminados com um ou mais tipos de tricotecenos resultam, principalmente, das infecções dos estigmas no florescimento e insetos (Reid *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 2002). Em trigo, o período de antese apresenta-se como o principal período para ocorrência de infecções dessa espécie, podendo, no entanto, se estender após este estágio de desenvolvimento (Cowger *et al.*, 2009; Del Ponte *et al.*, 2007). As anteras presas, ou parcialmente extrusadas, podem ter importante papel epidemiológico por ampliar o período de suscetibilidade e favorecer o estabelecimento das infecções em trigo (Panisson *et al.*, 2002).

A principal fonte de inóculo de *F. graminearum* para infecções dos órgãos florais são os restos culturais de milho e trigo (Sutton, 1982), embora sejam relatados outros hospedeiros como gramíneas (Landschoot *et al.*, 2011), bem como a soja (Martinelli *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2013). O fungo sobrevive na forma de micélio, colonizando estes tecidos vegetais e produzindo ascósporos que são ejetados de dentro dos peritécios, formados sobre os colmos de milho (Figura 2) (Trail *et al.*, 2002; Pereyra & Dill-Macky, 2008). Estes ascósporos podem ser transportados por longas distâncias pelo ar até plantas suscetíveis de milho e trigo durante suas estações de cultivo (Schmale *et al.*, 2011a; Keller *et al.*, 2013). Prussin *et al.* (2014) usando um haplótipo raro, observaram que os clones viáveis de *F. graminearum* puderam ser recuperados em distâncias de até 750 m da fonte de inóculo, demonstrando assim a capacidade de dispersão a longa distância.

A concentração de ascósporos na atmosfera é favorecida após 2 a 3 dias consecutivos de chuva e com umidade relativa superior a 80% (Paulitz, 1996), declinando com mais de 3 dias consecutivos de chuva (Del Ponte *et al.*, 2005). No entanto, a viabilidade dos esporos é reduzida em condições de baixa umidade relativa do ar (< 50%) e temperatura elevada (> 30 °C) (Beyer & Verret, 2005; Gilbert *et al.*, 2008).



FIGURA 2. Detalhe de peritécios de *Fusarium graminearum* sobre colmo de milho em decomposição.

Outra fonte de inóculo de *F. graminearum* são as sementes infectadas de milho e trigo, as quais podem transmitir o patógeno das sementes infectadas para a parte aérea do trigo (Fernandez *et al.*, 2009) e do milho (Munkvold & O'Mara, 2002). No entanto, alguns estudos não observaram associação entre semente infectadas e intensidade de giberela nos grãos colhidos de trigo (Gilbert & Haber, 2013). Do mesmo modo, em milho a infecção de sementes por *F. graminearum* parece ter menor importância como fonte de inóculo para infecções nas espigas em relação aos ascósporos oriundos de

peritécios em restos culturais (Pereyra *et al.*, 2004; Pereyra & Dill-Macky, 2008). Diferente de *F. verticillioides*, para o qual a semente de milho é um eficiente mecanismo de disseminação e transmissão desse fungo para as espigas (Murillo-Williams & Munkvold, 2008; Wilke *et al.*, 2007). Há ocorrência simultânea de diferentes espécies de *Fusarium* em sementes de milho (Munkvold & O'Mara, 2002), no entanto a interação desta co-ocorrência neste nicho ecológico e as estratégias de competição destas espécies ainda são pouco compreendidas (Marín *et al.*, 1998; Xu & Nicholson, 2009). Além disto, a introdução de sementes infectadas pode favorecer a introdução e o estabelecimento de diferentes espécies do complexo *F. graminearum* (diferentes genótipos) em área isentas, reduzir a germinação e a emergência de plantas, causar infecções em raízes e colmos, resultando em restos culturais infectados (McGee, 1995; Inch & Gilbert, 2003; Munkvold, 2009). Recentemente foi sugerido que a espécie *F. boothii* teria sido introduzida na França via sementes importadas, evidenciando a importância que a identificação das espécies filogenéticas pode assumir no comércio internacional (Boutigny *et al.*, 2013).

2.8 Manejo da giberela em milho e trigo

Em face da ampla gama de hospedeiros, a diversidade genética e a existência de diferentes fontes de inóculo de *F. graminearum*, além das diferentes condições edafoclimáticas em que o milho e o trigo são cultivados, as medidas de manejo visando o controle e redução de epidemias de giberela nessas duas culturas têm se concentrado na escolha da cultivar de trigo (Yan *et al.*, 2011) ou de híbrido de milho (Mesterházy *et al.*, 2012) com níveis de resistência, épocas de plantio, manejo de resíduos (citar trabalhos) e aplicação de fungicidas nos órgãos aéreos (Fernandez *et al.*, 2009; McMullen *et al.*, 1997; Mesterházy *et al.*, 2012; Spolti *et al.*, 2014).

O uso integrado de cultivares de trigo com níveis mais elevados de resistência com fungicidas triazóis, como por exemplo o meteconazole (Paul *et al.*, 2008; Spolti *et al.*, 2013), aumenta a eficiência de controle da doença e de DON. No entanto, o uso exclusivo da resistência varietal não garante o controle da doença e a concentração de DON nos grãos em níveis aceitáveis (Willyerd *et al.*, 2012; Wegulo *et al.*, 2013). Na cultura do milho, híbridos com nível de resistência à podridão da espiga e/ou colmo de giberela ainda são limitados e assistência técnica carece de informações sobre eficiência de controle de fungicidas direcionadas a espiga visando a podridão de giberela.

Outra medida adotada em muitos países é o estabelecimento de legislação para limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas que os grãos podem apresentar tanto para consumo humano quanto animal (van Egmond *et al.*, 2007). No Brasil, em 2011, foi implementado o LMT de algumas micotoxinas para milho e trigo. A partir de 2017, o LMT de DON em milho e trigo será estabelecido em 3 ppm (Anvisa, 2011), com impacto direto sobre os produtores, pela rejeição de lotes ou pela redução de seus valores. Nesse sentido, a legislação brasileira ainda não contempla um valor de LMT para NIV, sendo que levantamentos de DON e NIV em amostras de grãos de trigo comerciais do sul do Brasil mostraram que ambas as toxinas estão presentes, alertando quanto ao risco de exposição não somente a DON, mas também a NIV (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2011; Del Ponte & Furlong, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo 1: Diversidade de espécies em restos culturais de milho

3.1.1 Área de estudo e amostragem

Entre os meses de agosto a novembro de 2011, fragmentos de colmos de milho foram coletados em três áreas de lavoura ou pousio em cinco regiões do Estado do Rio Grande do Sul (RS), totalizando 15 áreas (Figura 3).

Em cada área visitada foram coletados , ao acaso, no mínimo 30 segmentos de colmos de plantas de milho que apresentavam peritécios típicos de *F. graminearum*. Em laboratório, os colmos coletados foram previamente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, lavados duas vezes com água esterilizada, secos e acondicionados em temperatura de -4 °C até serem processados.

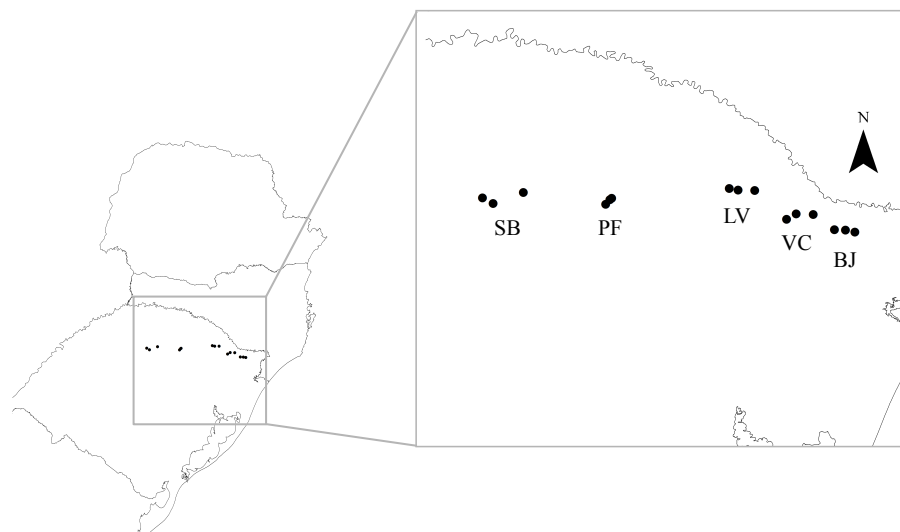


FIGURA 3. Localização geográfica de 15 áreas agrícolas (pontos) em cinco regiões no norte do Estado do Rio grande do Sul onde foram feitas coletas de colmos de milho em decomposição da safra anterior com sinais (peritécios) de *F. graminearum*. SB=Santa Bárbara; PF=Passo Fundo; LV=Lagoa Vermelha; VC=Vacaria e BJ=Bom Jesus.

3.1.2 Isolamento, purificação e caracterização morfológica

Cada colmo foi desinfestado em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por 30 s e lavados duas vezes com água esterilizada. De cada colmo, sob lupa estereoscópica, foi retirado com auxílio de uma agulha histológica um peritécio, o que resultou em pelo menos 90 peritécios por região. Individualmente cada peritécio foi posicionado sob papel filtro umedecido na tampa de uma placa de Petri, a qual encontrava-se invertida e contendo meio ágar-água (AA) Os ascósporos foram recuperados pela ejeção a partir do interior dos peritécios, os quais deram origem aos cultivos monoascospóricos (Leslie & Summerell, 2006). A presença de macroconídios foi observada em meio de SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) e as características da colônia e de pigmentação em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) (Summerell *et al.*, 2003). Um total de 450 isolados monospóricos foram obtidos dos peritécios (90/região x 5 regiões) e apresentaram características morfológicas condizentes com *Fusarium graminearum*

sensu lato (Leslie & Summerell, 2006). Desses, foram selecionados 300 isolados (20 de cada área) para identificação da espécie filogenética e genótipo tricoteceno por método molecular.

3.1.3 Produção de micélio e extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir do micélio fúngico de colônias purificadas dos isolados utilizando o método CTAB (cetil-trimetil-amônio-brometo) utilizado por Nicholson (1998). Resumidamente, todos os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de BDA (batata-dextrose-ágar), em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 h durante sete dias. Após este período o micélio superficial foi coletado, macerado na presença de nitrogênio líquido e extraído com CTAB. O *pellet* de DNA obtido da extração foi ressuspenso em TE 1x (tampão de eluição) e armazenado à -20 °C.

3.1.4 Determinação das espécies e genótipos tricotecenos

A identificação da espécie e do genótipo tricotecenos foi feita com base na técnica *multilocus genotyping* (MLGT) que se baseia na extensão do primer alelo-específico com 41 sondas alvo para as espécies e para o genótipo tricoteceno específico (Ward *et al.*, 2008). O MLGT foi realizado como descrito anteriormente (Ward *et al.*, 2008) e consistiu de uma amplificação *multiplex* de seis regiões genômicas contendo variação nucleotídica das espécies e genótipos tricotecenos específico. As reações foram determinadas por intensidade de fluorescência e de espectro utilizando um citômetro de fluxo Luminex 100 (Luminex Corporation). Essas identificações foram feitas no Laboratório Bacterial Foodborne Pathogens and Mycology, USDA-ARS, Peoria, IL, Estados Unidos.

3.1.5 Taxa de crescimento micelial em duas temperaturas

Discos de micélio com diâmetro de 6 mm foram posicionados com o crescimento micelial em contato com o meio BDA em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Após, o material foi incubado em escuro contínuo nas temperaturas de 15 °C ou 25 °C, que constituíram os tratamentos. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas em intervalos de 24 h durante cinco dias. O diâmetro de cada colônia foi tomado em duas direções perpendiculares. Três placas, que constituíram as repetições, foram utilizadas para cada isolado. Os diâmetros médios de cada isolado foram usados para calcular a taxa de crescimento radial em cada temperatura, ou seja, o crescimento no quinto dia dividido pelo número de dias (Kuhnem Júnior *et al.*, 2013).

Na análise dos dados foi usado um teste de permutação para avaliar a significância da variância entre os isolados a partir de uma matriz de semelhança entre as unidades amostrais, estabelecida pela distância Euclidiana (Torres *et al.*, 2010). As médias da taxa de crescimento micelial, nas duas temperaturas, foram discriminadas por contraste ortogonal entre isolados das espécies do complexo *F. graminearum*. A significância do contraste foi definida com 10.000 permutações (Torres *et al.*, 2010).

3.2 **Estudo 2: Genótipos tricotecenos de *Fusarium graminearum* em diferentes habitats em três agroecossistemas de Nova York³**

3.2.1 **Área e habitats amostrados**

Os isolados foram coletados em três agroecossistemas do Estado de Nova York nas safras 2012 e 2013. As três regiões selecionadas foram: a) Aurora, amostrada em 2012 e 2013 – no condado de Cayuga, região central de NY, planície central – basicamente plana com produção de grãos generalizada; b) Belmont, amostrada em 2013 – condado de Allegany, região sudoeste de NY, planalto – montanhoso, região de florestas com culturas de grãos na região dos vales; e c) Willsboro, amostrada em 2013 – condado de Essex, noroeste de NY, Vale – amplo vale com áreas agrícolas dispersas entre as Montanhas Adirondack e o lago Champlain (Figura 13).

Em cada uma das quatro localidades-ano, as amostragens foram feitas em quatro diferentes habitats que representam estágios do ciclo biológico de *F. graminearum*, incluindo as fases saprofíticas e patogênicas (peritécios em colmos de milho em decomposição, ar acima do dossel, grãos sintomáticos de trigo e milho).

3.2.2 **Amostragem e procedimentos de isolamento**

Para compor a coleção de isolados da fase saprofítica, colmos de milho exibindo peritécios foram coletados em cada campo amostrado. No laboratório, os colmos foram superficialmente desinfestados sendo imersos por 30 s em etanol 70%, após por mais 30 s em solução de hipoclorito de sódio 0,2%, lavadas com água

³ Artigo publicado: Kuhnem, P.R., Spolti, P, Del Ponte, E.M., Cummings, J., Bergstrom, G.C. 2015. Trichothecene genotype composition of *Fusarium graminearum* not differentiated among isolates from maize stubble, maize ears, wheat spikes, and the atmosphere in New York. Phytopathology. Doi: PHYTO-10-14-0266-R.

esterilizada por três vezes, e sob lupa microscópica um peritécio por colmo foi colocado em meio de cultura de BDA. Isolados foram obtidos das colônias oriundas dos peritécios, sendo purificados pelo método de isolamento monospórico (Leslie & Summerell, 2006).

Para compor a coleção do ar atmosférico, isolados fúngicos foram coletados usando placas de Petri contendo meio de cultura de Nash-Snyder colocadas em coletores de esporos do tipo estacionário posicionados acima do dossel do trigo (Figura 4A e B) e do milho. As amostragens foram realizadas usando seis placas em cada dia de exposição durante 10 dias (9:00 h às 9:00 h) quando as plantas de trigo estavam em antese e as plantas de milho apresentavam os estigmas exteriorizados. Após cada período de exposição, as placas foram cobertas e retornaram para o laboratório onde foram incubadas por 4-5 dias à temperatura ambiente (22 °C) sob fotoperíodo de 12 h (Figura 4C) (Schmale *et al.*, 2006). Como o meio de Nash-Snyder é conhecido por produzir cultura de *Fusarium* fora do padrão, de cada placa quatro colônias candidatas de *F. graminearum* foram transferidas para meio de BDA (Figura 4D). Cada colônia foi realizado isolamento monospórico e morfológicamente identificada como *F. graminearum* (Leslie & Summerell, 2006).

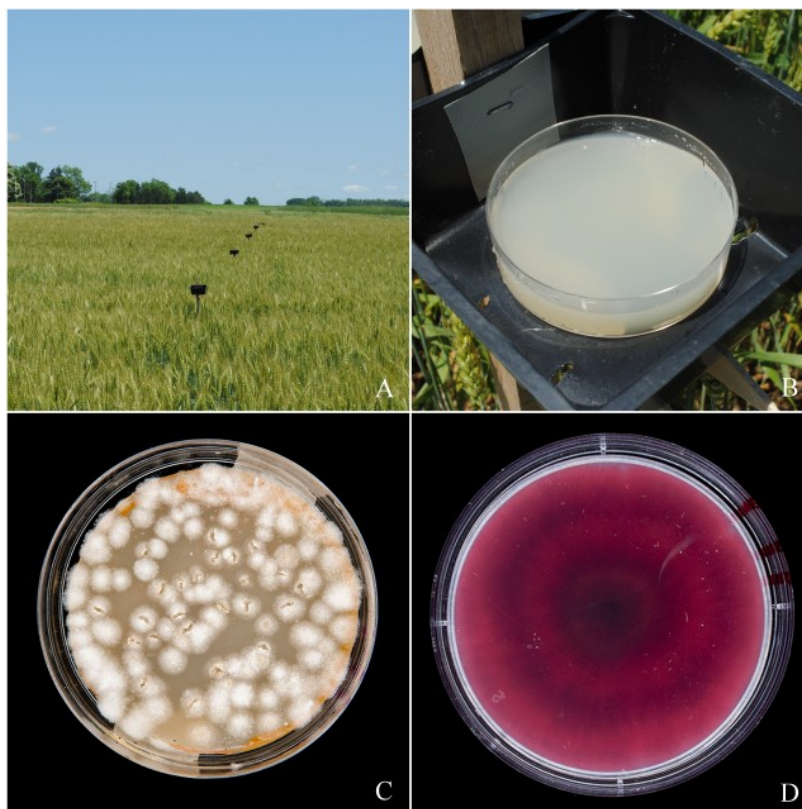


FIGURA 4. Coletor de esporos contendo placa de Petri com meio semi-seletivo para *Fusarium* (A e B), colônias candidatas de *Fusarium graminearum* em meio de Nash-Snyder após 5 dias de incubação (C) e colônia monospórica de *F. graminearum* em meio de batata-dextrose-ágar (D).

Para compor a coleção da fase patogênica, grãos maduros com sintomas de giberela de trigo e milho foram superficialmente desinfestados (5 min em etanol 70% etanol, 5 min em NaOCl 0,5% e lavadas duas vezes em água esterilizada), secas em câmara de fluxo laminar, plaqueadas em BDA e incubadas por 6 dias à temperatura ambiente (22 °C) sob fotoperíodo de 12 h (Figura 5). Foi selecionado apenas um isolados por espiga de trigo ou de milho afim de evitar clonagem de isolados. Colônias de *Fusarium* foram transferidas para novas placas de BDA e obtidos isolados monospóricos (Leslie & Summerell, 2006).

Todos os isolados purificados foram identificados e estocados em glicerol 15% à -80 °C no Departamento de Plant Pathology and Plant Micro-biology, Cornell University, Ithaca, New York, EUA.

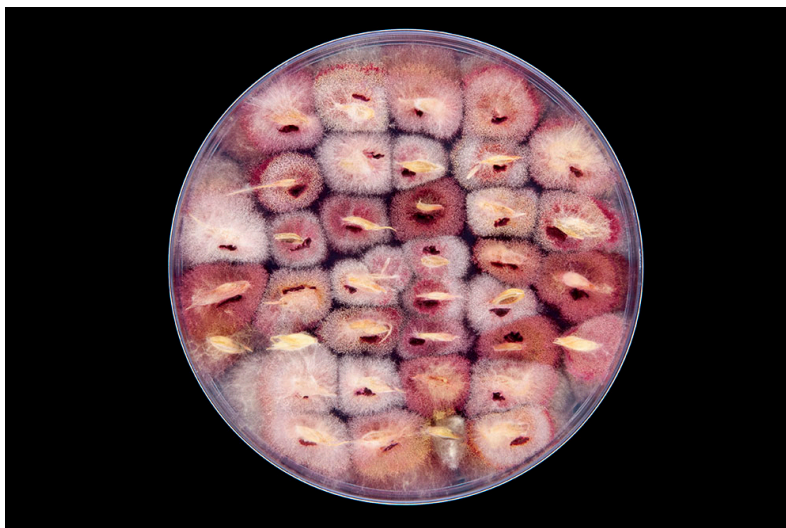


FIGURA 5. Sementes de trigo com sinais de giberela em meio de cultura de batata-dextrose-ágar após 6 dias de incubação confirmando a infecção pelo patógeno com o crescimento das colônias típicas de *Fusarium graminearum*.

3.2.3 Extração de DNA e teste de PCR

Micélio fúngico foi coletado de culturas de *F. graminearum* crescidos em meio de cultura de BDA com sete dias de idade. O DNA foi extraído usando protocolo de extração PrepMan[®] (Life technologies). Após a extração, em cada amostra foi realizado o método de precipitação de ácido nucleico para reduzir possíveis inibidores da PCR. As amostras foram estocadas à -20 °C até serem processadas. GoTaq[®] Green Master Mix foi utilizado nos protocolos de PCR para a identificação dos genótipos tricotecenos 3-ADON, 15-ADON, ou nivalenol (NIV), baseados na amplificação das porções dos genes *Tri3* e *Tri12* (Ward *et al.*, 2008). O resultado dos produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados sob luz UV.

3.2.4 Análise de dados

O teste qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar as frequências dos genótipos tricotecenos entre os quatro habitats (colmos de milho, ar, grão de trigo e milho) em cada localidade, entre os quatro locais-ano (Aurora-2012, Aurora-2013, Belmont-2013 e Willsboro-2013) e entre os anos de 2012 e 2013 na localidade de Aurora. As análises foram conduzidas no SAS (versão 9.2, Statistical Analysis System; SAS Institute, Cary, NC).

3.3 Estudo 3: Agressividade e perfil toxigênico de *Fusarium graminearum* de milho e trigo inoculados em ambos hospedeiros.⁴

3.3.1 Coleção de isolados e testes de patogenicidade

Foram selecionados 15 isolados de *F. graminearum* neste estudo, sendo sete oriundos de espigas sintomáticas de trigo e oito oriundos de espigas de milho (Tabela 1). Estes isolados foram selecionados arbitrariamente de uma coleção de isolados coletados nas safras de 2011 e 2012 em New York (G. C. Bergstrom, *dados não publicados*), e que tiveram seu genótipo tricoteceno determinado por PCR tendo como alvo os genes *Tri3* e *Tri12* (Figura 15) (Ward *et al.*, 2002). Foram escolhidos sete isolados 15-ADON e oito isolados 3-ADON. Adicionalmente um isolado do genótipo 15-ADON obtido de espigas de trigo (Gz014NY98), agressivo e potente produtor de DON/15-ADON, e utilizado por vários anos como inóculo para avaliações de reação de cultivares à giberela e ensaios de eficiência de fungicidas em New York, foi incluído

⁴ Artigo no prelo: Kuhnem, P.R., Del Ponte, E.M., Dong, Y., Bergstrom, G.C. 2015. *Fusarium graminearum* isolates from wheat and maize in New York show similar range of aggressiveness and toxigenicity in cross-species pathogenicity tests. *Phytopathology*. Doi: 10.1094/PHYTO-07-14-0208-R

como isolado referência. Todos os isolados utilizados foram purificados e as culturas oriundas de cultivo monospóricas e armazenadas em glicerol à -80 °C.

Três ensaios de agressividade foram usados para avaliar e comparar os isolados. A severidade de giberela e produção de micotoxinas em trigo e tombamento de plântulas de milho foram realizadas em casa de vegetação. A severidade da podridão de giberela e produção de micotoxinas foram avaliadas em espigas de milho inoculadas no campo.

TABELA 1. Informação dos 16 isolados de *Fusarium graminearum* avaliados quanto a agressividade no campo (espigas de milho) e casa de vegetação (sementes de milho e espigas de trigo) em Ithaca, NY, 2013.

Número	Isolado	Ano	Hospedeiro de origem	Genótipo ^a
1	Gz829NY	2011	Milho	15-ADON
2	Gz835NY	2011	Milho	15-ADON
3	Gz941NY	2012	Milho	15-ADON
4	Gz978NY	2012	Milho	15-ADON
5	Gz014NY	1998	Trigo	15-ADON
6	Gz443NY	2011	Trigo	15-ADON
7	Gz446NY	2011	Trigo	15-ADON
8	Gz478NY	2011	Trigo	15-ADON
9	Gz859NY	2011	Trigo	15-ADON
10	Gz830NY	2011	Milho	3-ADON
11	Gz955NY	2012	Milho	3-ADON
12	Gz970NY	2012	Milho	3-ADON
13	Gz982NY	2012	Milho	3-ADON
14	Gz438NY	2011	Trigo	3-ADON
15	Gz479NY	2011	Trigo	3-ADON
16	Gz603NY	2011	Trigo	3-ADON

^a Genotipagem para determinar o potencial de produção dos tricotecenos 15-acetildeoxinivalenol(ADON) e 3-ADON pelos primers *Tri3* e *Tri12* (Ward et al., 2002).

3.3.2 Agressividade e produção de micotoxinas em espigas de trigo.

Sementes da cultivar ‘Norm’, classificada como altamente suscetível a giberela, foram semeadas em vasos de 15 cm de diâmetro (7 sementes/vaso), contendo substrato formulado “Cornell Mix” (0,1 m² de turfa comprimida, 0,1 m² de vermiculita, 9,1 kg de calcário dolomítico e 2,7 kg de fertilizante 11-5-11). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por oito semanas até a inoculação em temperatura entre 20 °C à 25 °C com luminosidade de 14 h/dia e desbastadas para manter cinco perfilhos principais em cada vaso (Crane *et al.*, 2013).

As espigas de trigo foram inoculadas no estágio de grão leitoso (Zadoks 73), previamente determinado como o estágio mais suscetível na cv. Norm (Del Ponte *et al.* 2007). A espiguetas central de cada espiga foi marcada e uma alíquota de 20 µl de uma suspensão de esporos (5×10^4 macroconidia/ml) foi inoculada no interior da espiguetas (Figura 6A) (Engle *et al.*, 2003). As espigas foram individualmente cobertas com saco plástico e mantidas cobertas por 48 h com temperatura de 25 °C e com ciclo de 14 h de luminosidade (Figura 6B). Os sacos foram então removidos e as plantas mantidas na casa de vegetação até a colheita (\approx 45 dias após a inoculação).

A agressividade de cada isolado foi determinada pela avaliação da proporção de espiguetas com sintomas de giberela (porcentagem de espiguetas gibereladas/total de espiguetas) em cada espiga inoculada após 10 dias da inoculação (Figura 6C). Foram utilizadas quatro repetições, sendo cada uma das repetições um vaso contendo cinco espigas principais.



FIGURA 6. Inoculação de *Fusarium graminearum* pelo método de flor única em espigas de trigo (A), espigas cobertas com saco plástico e mantidas cobertas por 48 h após a inoculação com temperatura de 25 °C e com ciclo de 14 h de luminosidade (B) e espigas mostrando sintomas de giberela 10 dias após a inoculação.

A produção de micotoxina para cada um dos 16 isolados foi avaliada pela combinação de todas as espigas inoculadas. Antes da análise química, os grãos colhidos foram moídos e uma amostra de 25 g para cada isolado obtidas. A quantidade de DON, 15-ADON, 3-ADON e ZEA (zearalenona) foi quantificada usando o método de cromatografia gasosa com espectro de massa (GC-MS) (Jin *et al.*, 2014).

3.3.3 Agressividade e produção de micotoxinas em espigas de milho.

Durante a safra de 2013, sementes do híbrido da empresa Monsanto DKC45-51©, com reação de suscetibilidade a podridão de giberela, foram semeadas no campo na fazenda experimental da Cornell University “Musgrave Research Farm” em Aurora, NY, US. O experimento foi repetido no tempo, a diferença das semeaduras entre os experimentos foi de 20 dias, sendo os experimentos considerados independentes.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com quatro repetições por tratamento (isolado). Casa parcela foi composta de uma linha de 4 metros de comprimento (75 cm entrelinhas) com 12 plantas. As oito plantas centrais de cada linha foram inoculadas. Os dois experimentos possuíram bordas com o mesmo híbrido. A adubação e controle de plantas daninhas foram realizadas de acordo com as recomendações locais.

Para cada isolado foi preparado uma suspensão de esporos como descrito anteriormente (Reid *et al.*, 1995). Após quatro dias da exteriorização do estigma (Reid *et al.*, 2002), as plantas foram individualmente inoculadas pela injeção das suspensões de esporo (2ml de 5×10^5 macroconidia/ml) ou água esterilizada (controle) dentro do estigma da espiga principal (Reid *et al.*, 1995) (Figura 7A). Nos dois experimentos, após a inoculação os três dias posteriores a inoculação foram chuvosos.

As plantas foram colhidas nove semanas após a inoculação, sendo as espigas colhidas manualmente, despalhadas e avaliada quanto a severidade da doença (porcentagem de área da espiga com sintomas de podridão de giberela) (Figura 7B) (Reid *et al.*, 2002). Posteriormente as espigas foram secas a 65 °C até atingirem 13% de umidade e pesadas. Todos os grãos de todas as 32 espigas inoculadas (8 espigas x 4 repetições) foram misturados e triturados para análise de micotoxinas em 25 g de cada amostra, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.2.2.



FIGURA 7. Inoculação de *Fusarium graminearum* em espigas de milho aos três dias após a exteriorização dos estigmas (A) e espiga de milho mostrando sintomas de podridão de giberela nove semanas após a inoculação (B).

3.3.4 Tombamento de plântulas de milho

Sementes sem tratamento químico do híbrido da empresa Monsanto DKC59-90©, um híbrido de milho conhecido pela suscetibilidade a podridão de giberela, foi usado para inocular os isolados pelo método de imersão (Wilke *et al.*, 2007). O inóculo consistiu de uma suspensão de esporos (1×10^6 macroconidia/ml) obtida de colônias de 10 dias de idade. Cada colônia foi originada de cultivo monospórico dos isolados de *F. graminearum* crescidas em BDA+A (antibiótico) a 23 °C e fotoperíodo de 12 h. As sementes foram desinfestadas (2 min em 0,5% NaOCl, lavadas duas vezes por 1 min em água esterilizada) e colocadas para secar em papel filtro esterilizado dentro da câmara de fluxo laminar. Após secas, as sementes foram colocadas em tubos Erlenmeyer de 250 ml (100 sementes/tubo) contendo 100 ml da suspensão de esporos ou água esterilizada (controle). Os tubos foram colocados em mesa rotatória a 125 rpm

for 12 h. Após este período as sementes foram colocadas novamente para secar em papel filtro esterilizado dentro da câmara de fluxo laminar.

De cada tratamento (isolados), 20 sementes foram plaqueadas diretamente em BDA+A para determinar a taxa de infestação. Quarenta sementes foram desinfestadas (5 min em etanol 70%, 5 min em NaOCl 0,5% e lavadas por duas vezes em água esterilizada), secas e plaqueadas também em BDA+A separadamente, para determinar a taxa de infecção do método. Ambas sementes foram incubadas a 23 °C e escuro total por 6 dias. As taxas de infestação e infecção foram determinadas baseadas na proporção de sementes colonizadas. A germinação de sementes também foi determinada nos tratamentos e controle, afim de observar se o método afetou o poder germinativo das sementes.

As sementes previamente inoculadas e controle foram semeadas em vaso de 15 cm de diâmetro (7 sementes/vaso), contendo substrato formulado “Cornell Mix” (0,1 m² de turfa comprimida, 0,1 m² de vermiculita, 9,1 kg de calcário dolomítico e 2,7 kg de fertilizante 11-5-11). Foram utilizadas quatro repetições (vasos) para cada isolado e controle. Após a semeadura os vasos permaneceram por 14 dias em casa de vegetação a 25 °C e sob foroperíodo de 14 h. Durante o período as plantas foram diariamente regadas com água.

Após 14 dias da semeadura, quatro variáveis foram avaliadas: taxa de emergência (sementes com comprimento de plântula >2 mm acima do nível do solo), comprimento de plântula e raiz (cm), peso seco de plântula e raiz (g) e incidência de tombamento de plântulas (plântula ou raiz visivelmente necrosadas) (Figura 8).



FIGURA 8. Sintoma de tombamento de plântula de milho (A), plântula e raiz necrosadas (B) e plântula e raiz saudáveis (C).

3.3.5 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental de blocos ao acaso e repetidos em ensaios independentes. O isolado referência (Gz014NY98) não foi incluído nas análises, uma vez que este já foi previamente caracterizado como agressivo e toxigênico. Os dados dos dois ensaios nos três experimentos apresentaram normalidade (Shapiro-Wilks), homogeneidade das variâncias (Levene's) e usando ensaios com fator a ANOVA mostrou não haver diferença significativa ($P > 0.05$), logo os dados foram combinados.

Para comparar os isolados, dois contrastes ortogonais foram usados para comparar isolados oriundos de milho vs. isolados oriundos de trigo, e isolados do genótipo 3-ADON vs. 15-ADON. A significância dos contrastes foi avaliada por teste de aleatorização (10.000 permutações) (Torres *et al.*, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo 1: Diversidade de espécies em restos culturais de milho.

4.1.1 Resultados

4.1.1.1 Determinação das espécies e genótipos tricotecenos

As áreas amostradas variaram em altitude de 450 a 1.100 m de altitude, sendo possível recuperar isolados de *F. graminearum* dos peritécios formados em colmos de milho em decomposição em todas as 15 áreas (Tabela 2). No total, 295 isolados monospóricos de *F. graminearum* sensu lato foram recuperados dos peritécios e identificados sua espécie filogenética e genótipo tricoteceno (Tabela 2). Vinte e quatro isolados não reconhecidos pela técnica MLGT foram submetidos ao sequenciamento do gene fator de alongação-1 α (Tef-1 α).

Foram identificadas as espécies *F. meridionale* (Fmer) (155/295), *F. graminearum* (Fgra) (83/295), e *F. cortaderiae* (Fcor) (57/295) (Tabela 2). A espécie Fmer foi a única a ocorrer em todas as áreas amostradas e a única encontrada em um local amostrado com prevalência de 100% (SB.2) (Tabela 2; Figura 9). Porém, na região de Bom Jesus (>1.000 m) a incidência de Fmer foi menor (16%), não sendo mais a espécie dominante tal como nas outras áreas (Figura 9), exceção as áreas PF.2, PF.3 e

VC.1, onde predominou Fgra (Tabela 2; Figura 9). Com exceção de oito isolados encontrados na área LV.1, Fcor foi observado em altitudes elevadas (> 800 m), tornando-se a espécie dominante, com 56% (35-88%) de incidência na região de Bom Jesus (Figura 9).

TABELA 2. Informações e identificação de isolados do complexo *Fusarium graminearum* obtidos de peritécios em colmos de milho em decomposição com base em genotipagem multiloco.

Região.área ¹	Uso da área na entressafra	Altitude (m)	N. de isolados	Espécie ²			
				Fgra15A	Fcor3A	FcorNIV	FmerNIV
SB.1	Aveia	452	18	2	NE	NE	16
SB.2	Trigo	498	20	1	NE	NE	19
SB.3	Aveia	500	21	NE ³	NE	NE	21
PF.1	Trigo	520	20	10	NE	NE	10
PF.2	Trigo	545	18	16	NE	NE	2
PF.3	Trigo	555	20	9	5	NE	6
LV.1	Azevem	829	20	1	6	2	11
LV.2	Azevem	830	20	1	1	NE	18
LV.3	Cevada	844	21	10	NE	NE	11
VC.1	Trigo	900	20	16	NE	1	3
VC.2	Trigo	940	20	NE	NE	3	17
VC.3	Azevem	961	20	7	4	NE	9
BJ.1	Azevem	1.005	17	5	1	8	3
BJ.2	Azevem	1.037	20	NE	NE	15	5
BJ.3	Azevem	1.073	20	5	4	7	4
Total			295	83	21	36	155

¹ SB = Santa Bárbara; PF = Passo Fundo; LV = Lagoa Vermelha; VC = Vacaria; BJ = Bom Jesus.

² Fgra15A = *Fusarium graminearum* genótipo 15-ADON; Fcor3A = *Fusarium cortaderiae* genótipo 3-ADON; FcorNIV = *Fusarium cortaderiae* genótipo nivalenol e FmerNIV = *Fusarium meridionale*, genótipo nivalenol.

³ NE = não encontrado.

Todos os isolados Fgra apresentaram genótipo 15-ADON (Fgra15A), enquanto todos *Fmer* foram identificados como NIV (FmerNIV). A espécie *Fcor* apresentou isolados com os genótipos 3-ADON (Fcor3A) e NIV (FcorNIV) (Figura 9). Houve predomínio do genótipo NIV na média de todas as áreas (65%) amostradas, seguido do

genótipo 15-ADON (28%) e do genótipo 3-ADON (7,0%) (Figura 9). No entanto, a proporção do genótipo NIV relacionada a Fmer diminuiu à medida que aumentou a altitude das áreas (100-23%), onde aumentou a incidência de FcorNIV (0-77%) (Tabela 2; Figura 9).

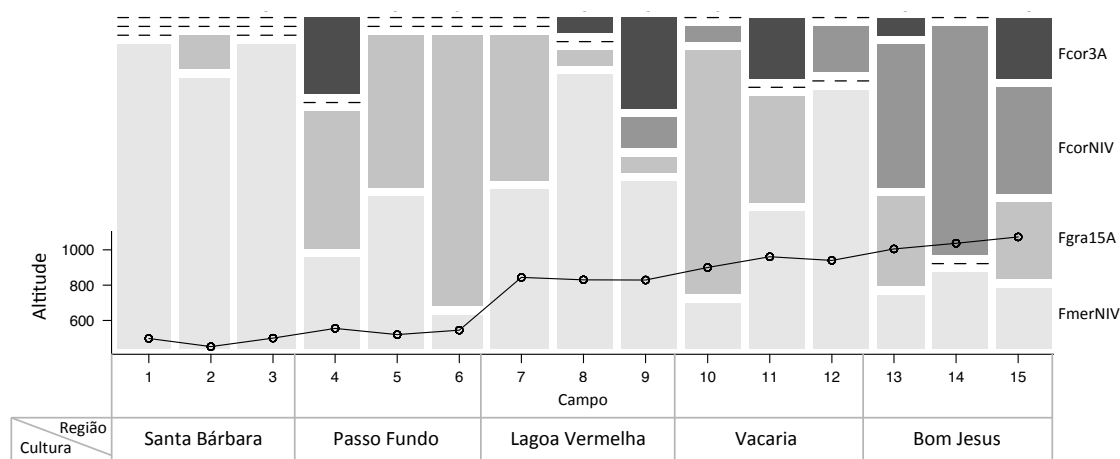


FIGURA 9. Frequência de três espécies, e seus respectivos genótipos tricotecenos, do complexo *Fusarium graminearum* identificadas em uma coleção de 295 isolados obtidos de peritécios presentes em colmos de milho em decomposição amostrados aleatoriamente em cada uma das 15 áreas localizadas em cinco regiões (SB = Santa Bárbara; PF = Passo Fundo; LV = Lagoa Vermelha; VC = Vacaria; BJ = Bom Jesus) no norte do Estado do Rio grande do Sul.

4.1.1.2 Taxa de crescimento micelial em duas temperaturas

Houve efeito significativo da temperatura na taxa de crescimento micelial das três espécies analisadas, sendo que todas as espécies tiveram, conforme esperado, uma taxa significativamente inferior a 15 °C ($5,86 \pm 0,97$) do que a 25 °C ($11,51 \pm 2,99$) (Figura 10). Não houve diferença entre os dois genótipos tricotecenos de Fcor, bem como desses para Fgra15A. No entanto, na temperatura de 25 °C apenas Fgra15A diferiu significativamente das demais espécies, apresentando a mais alta taxa de crescimento. Não houve diferença significativa entre os dois genótipos tricotecenos de

Fcor, assim como não diferiram entre si, os isolados do genótipo NIV das espécies Fcor e Fmer (Figura 10). A espécie Fgra15A apresentou maior resposta ao aumento da temperatura, com uma maior diferença na taxa de crescimento micelial (8,4 mm) entre 25 °C ($13,98 \pm 2,67$) e 15 °C ($5,58 \pm 0,59$), enquanto que FmerNIV, FcorNIV e Fcor3A apresentaram diferenças de 4,30, 4,30 e 4,26 mm respectivamente. Além disto, as espécies apresentaram variação distinta, sendo FmerNIV a espécie com maior variabilidade na população tanto a 15 °C quanto a 25 °C (Figura 10).

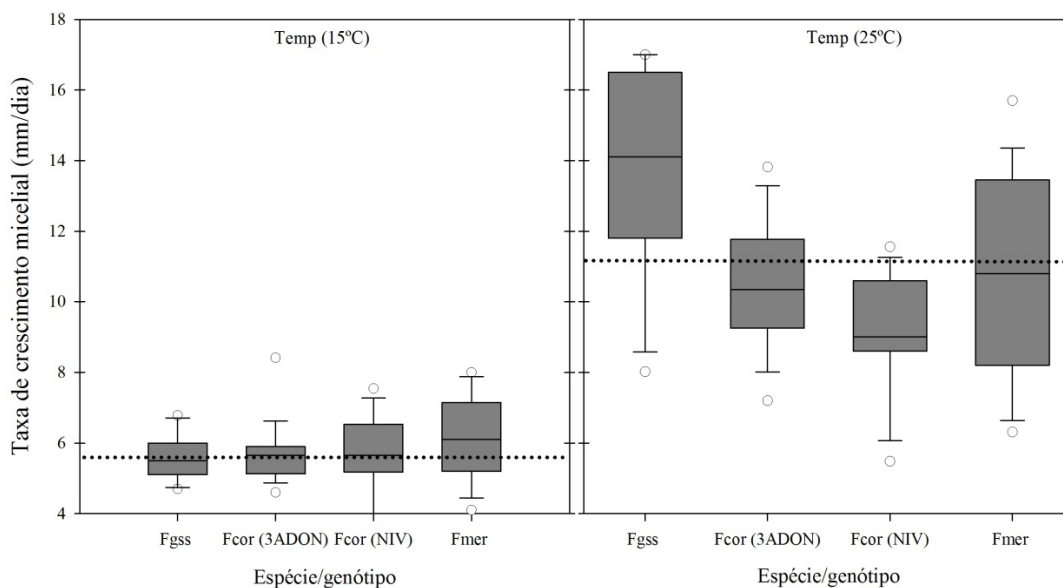


FIGURA 10. Taxa de crescimento micelial (mm/dia) nas temperaturas de 15 e 25 °C para 60 isolados do complexo *Fusarium graminearum*, sendo 15 isolados *F. graminearum* (Fgra15A), 15 isolados *F. cortaderiae* (Fcor) genótipo 3-ADON (Fcor3A) e 15 isolados genótipo NIV (FcorNIV), e 15 isolados *F. meridionale* (FmerNIV).

4.1.2 Discussão

Neste estudo foi observado que existem pelo menos três espécies do FGSC colonizando e formando peritécios em colmos de milho em decomposição no período de entressafra: Fcor, Fgra e Fmer. No Brasil, já foram relatadas essas e mais três outras espécies do FGSC, totalizando seis espécies filogenéticas ocorrendo em grãos e colmos de cereais e grãos e vagens de soja (Martinelli *et al.*, 2004; Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2015).

Enquanto todos os isolados Fmer (155) apresentaram o genótipo NIV (FmerNIV) e isolados Fgra (83) foram 15-ADON (Fgra15A), os isolados da espécie Fcor apresentaram os genótipos NIV (36/57) (FcorNIV) e 3-ADON (21/57) (Fcor3A). A maior frequência de Fcor com genótipo NIV encontrada neste estudo concorda com estudos prévios em diversos hospedeiros onde essa espécie tem apresentado apenas o genótipo NIV (O ‘Donnell *et al.*, 2004; Monds *et al.*, 2005; Boutigny *et al.*, 2011), embora exista relato de isolados produtores de 3-ADON, porém sem indicação do hospedeiro e região de origem (Aoki *et al.*, 2012). A baixa frequência do genótipo 3-ADON em peritécios em colmos de milho coincide com a baixa frequência (4,4%) de isolados com esse genótipo já relatado somente em levantamentos em grãos de cevada no estado do RS, porém identificados como *F. austroamericanum* (Astolfi *et al.*, 2012). Além disto, não há relatos de isolados de Fcor do genótipo 3-ADON infectando grãos ou colmos de milho no Brasil e no mundo.

A frequência de isolados FmerNIV na população total foi de >50%, com prevalência de 100% nas áreas amostradas, além de ser a única espécie ocorrendo isoladamente em dois locais. Valores similares ao reportados neste trabalho foram encontrados no Nepal, onde a frequência de Fmer em grãos de milho foi de 56%, sendo todos também do genótipo NIV (Desjardins *et al.*, 2008). Ainda nesse mesmo estudo

no Nepal, também foi observado FmerNIV como única espécie em dois locais. Na Argentina, em um estudo da diversidade do FGSC em grãos de milho 85% (56/66) dos isolados foram identificados como FmerNIV (Sampietro *et al.*, 2011). A maior prevalência e frequência nas áreas de peritécios da espécie Fmer, bem como o predomínio do genótipo NIV, indica uma vantagem desta espécie na fase saprofítica, a qual pode constituir a principal espécie presente no ambiente para infecções em espigas.

No trigo produzido no Sul do Brasil, ao contrário do milho, ocorre um predomínio de Fgra15A em relação à FmerNIV. Em isolados coletados na safra 2006, foi relatada uma frequência de 93% (76/82) de Fgra15A, sendo os outros 7% de FmerNIV (Scoz *et al.*, 2009). Também em grãos de trigo, em 140 isolados de três áreas na safra 2007, proporções similares de Fgra15A (92%) e FmerNIV (8%) foram encontradas (Astolfi *et al.*, 2012). Em grãos de cevada de lavouras do Estado do Rio Grande do Sul, colhidos em três safras (2007 a 2009) foi encontrada uma proporção cinco vezes maior de isolados FmerNIV que os relatados em trigo, porém ainda inferior a Fgra15A, sendo 66% de Fgra15A e 29,6% de FmerNIV (Astolfi *et al.*, 2011). Embora Fgra15A tenha apresentado uma frequência total menor (29,5%) que FmerNIV em peritécios no período de entressafra, houve locais onde Fgra15A foi a espécie predominante. A maior fonte de inóculo primário com FmerNIV no local pode explicar o predomínio de grãos infectados por essa espécie pelo maior aporte de ascósporos no ambiente (Keller *et al.*, 2011). No entanto, questões relacionadas à produção da micotoxinas, como fator de agressividade (Harris & Desjardins, 1999; Spolti *et al.*, 2012), preferência por hospedeiro (Boutigny *et al.*, 2011) e influxo de inóculo externo à lavoura (Schmale *et al.*, 2006) também podem influenciar na prevalência da espécie infectando os grãos.

Estudos sobre a contaminação com DON e NIV em grãos e alimentos relatam, mesmo em grãos de milho, que níveis de contaminação com DON são maiores que níveis de contaminação com NIV no mundo e no Brasil, até mesmo pelo fato de que em muitos poucos estudos se analisa a presença de NIV (Furlong *et al.*, 1995; Placinta *et al.*, 1999; Calori-Domingues *et al.*, 2007). Um estudo recente em amostras de grãos de trigo de lavouras comerciais do sul do Brasil mostrou a presença de NIV em níveis equiparáveis ou mais altos do que DON (Del Ponte *et al.*, 2012). Considerando o predomínio do genótipo NIV sobrevivendo saprofiticamente em sua fase sexual, estudos futuros devem esclarecer porque a espécie Fgra15A é dominante em cereais de inverno, apesar da maior abundância de FmerNIV em peritécios nas fontes primárias de inóculo para as epidemias.

Comparado ao trigo, menos se sabe sobre agressividade e variabilidade de isolados das espécies FGSC em milho (Carter *et al.*, 2002; Kuhnem Júnior *et al.*, 2013). Em trigo, estudos tem mostrado existir variação nas características fenotípicas entre as espécies FGSC (Goswami & Kistler, 2005). Neste trabalho também foi observado diferenças na taxa de crescimento micelial entre as espécies do FGSC, sendo que esta diferença esteve associada à mudança na temperatura.

Na temperatura de 25 °C Fgra15A apresentou maior taxa média de crescimento em relação às espécies FmerNIV e Fcor. Estes resultados corroboram com estudos prévios em trigo com isolados de Fgra15A e FmerNIV (Spolti *et al.*, 2012). No entanto, Kuhnem Júnior *et al.* (2013) não observaram diferenças no crescimento micelial à 25 °C de dois isolados Fgra15A e quatro isolados FmerNIV, assim como para outras características patogênicas em milho. A inconsistência nos resultados pode ser explicada pela variabilidade existente entre isolados da mesma espécie, uma vez que

alguns isolados da espécie *FmerNIV* ou *Fcor*, ambos genótipos, tiveram crescimento igual ou superior a isolados de *Fgra15A*.

A espécie com maior taxa média de crescimento à 15 °C foi *FmerNIV*. Nesta temperatura *Fgra15A* teve crescimento igual à espécie *Fcor*, independente ao genótipo. A capacidade de *FmerNIV* em crescer melhor em temperaturas baixas e possuir maior variabilidade entre isolados nas duas temperaturas, bem como o menor crescimento de *Fgra15A* na temperatura menor, pode explicar a prevalência destas espécies nos peritécios formados no período da estação fria. Ainda, a maior frequência de *Fgra15A* foi encontrada em regiões de mais baixa altitude (maior temperatura), enquanto que *FmerNIV* ocorreu em todas as áreas. Já *Fcor*, de ambos genótipos, ocorreu predominantemente nas regiões com altitudes superiores a 800 m.

Embora mudanças no perfil toxigênico ao longo do tempo em algumas regiões produtoras tenham sido associadas a possíveis vantagens adaptativas e diferenças de agressividade entre diferentes genótipos tricotecenos (Ward *et al.*, 2008), estudos recentes, no Canadá, mostraram não haver nenhuma diferença ou vantagem entre isolados *Fgra* com os genótipos 3-ADON e 15-ADON em relação a competitividade (Clear *et al.*, 2013). Deste modo, hipotetiza-se que a frequência das espécies do FGSC associadas com grãos de cereais no Brasil pode estar mais relacionada com o predomínio e distribuição dessas nos peritécios sobrevivendo saprofiticamente, bem como a preferência e seleção do hospedeiro (Carter *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2010; Boutigny *et al.*, 2011).

4.2 Estudo 2: Frequência dos genótipos tricotecenos de *Fusarium graminearum* em diferentes habitats em três agroecossistemas de Nova York.

4.2.1 Resultados

No total 1.407 isolados de *F. graminearum* foram obtidos e genotipados nas três regiões e nos dois anos amostrados, variando de 281 à 428 isolados por região (Figura 11). As análises moleculares baseadas nos genes *Tri3* e *Tri12* mostraram que de modo geral o genótipo 15-ADON foi dominante (83%), seguido do genótipo 3-ADON (17%). O genótipo NIV não foi detectado. Nos quatro locais (localidades e anos), e entre os quatro habitats, o genótipo 15-ADON também foi predominante (>88% dos isolados), com exceção da localidade de Willsboro onde os genótipos 3-ADON e 15-ADON foram encontrados em frequências similares (52% e 48%) (Figura 12).

No foi observado diferença estatística ($\chi^2=1,526$; $P=0,217$) na frequência dos genótipos tricotecenos quando comparada as populações de Aurora em 2012 e em 2013. Em 2012 a frequência média foi de 88% para o genótipo 15-ADON e 12% para 3-ADON, enquanto em 2013 os genótipos 15-ADON e 3-ADON representaram 94% e 6% da população de *F. graminearum*, respectivamente (Figura 12).

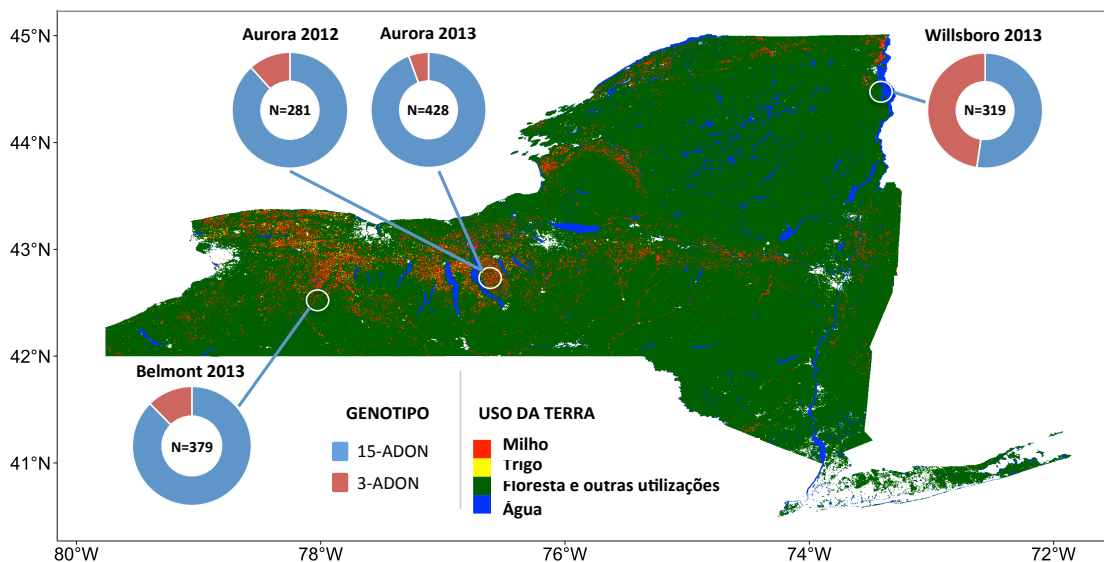


FIGURA 11. Uso da terra no Estado de Nova York e frequência relativa dos dois genótipos tricotecenos (3-ADON e 15-ADON) de *Fusarium graminearum*. Círculo representa o total de isolados (N) coletados em cada localidade/ano. Fonte dos dados: CropScape – Cropland data layer (NASS/USDA).

Quando comparada as frequências dos dois genótipos entre os quatro habitats dentro de cada localidade, as frequências não diferem em três das quatro localidades analisadas. Sendo o genótipo 15-ADON o dominante entre os quatro habitats (Figura 12). Em Aurora, a frequência do genótipo 15-ADON foi $>94\%$ nos quatro habitat ($\chi^2 = 0,192$; $P = 0,979$). Similar tendência foi observada em Belmont ($\chi^2 = 8,137$; $P = 0,053$), onde $>80\%$ dos isolados foram do genótipo 15-ADON (Figura 12). Mesmo em Willsboro onde a frequência de 3-ADON e 15-ADON foi similar, as frequências não diferiram entre os quatro habitats ($\chi^2 = 7,593$; $P = 0,055$), com 46/54% (3-ADON/15-ADON), 57/43%, 38/62%, e 44/56% nos colmos de milho, ar, grãos de milho e trigo, respectivamente (Figura 12). A exceção foi Aurora 2012, onde o genótipo 3-ADON não foi encontrado em grãos de trigo e a frequência deste genótipo foi significativamente superior nos colmos de milho (20%) ($\chi^2 = 26,395$; $P < 0,001$) (Figura 12).

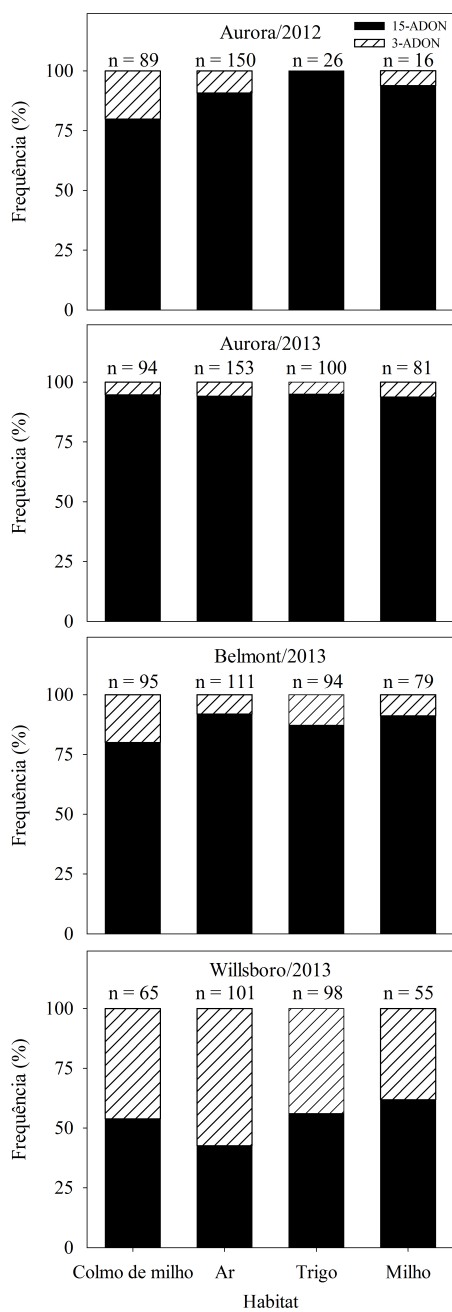


FIGURA 12. Genótipos tricotecenos de *Fusarium graminearum* isolados de colmos de milho, ar, grãos de trigo e de milho em três agroecossistemas em Nova York. Resultados estão expressos em porcentagem relativo ao total de isolados por habitat (N).

4.2.2 Discussão

Neste estudo, pelo menos do ponto de vista dos genótipos tricotecenos, as populações locais de *F. graminearum* parecem não ser estruturadas pelos quatro habitats analisados. Na maioria dos locais, a composição dos genótipos tricotecenos na fase saprofítica (colmos de milho) não diferiu das frequências observadas na fase patogênica (grão de milho e trigo) e o genótipo 15-ADON foi o predominante. A exceção foi a localidade de Aurora/2012 onde o genótipo 3-ADON não foi encontrado nos grãos de trigo, apesar de sua elevada frequência (20%) em colmos de milho. Porém tal diferença nas frequências pode estar relacionada ao tamanho da amostra reduzida devido a uma safra de clima seco, desfavorecendo as infecções em espigas de trigo e milho e resultando em baixo número amostral nestes dois habitats. O fato da frequência relativa de isolados 3-ADON na atmosfera ser similar entre as fases saprofítica e patogênica sugere que este genótipo não apresenta nenhuma vantagem relacionada ao *fitness* saprofítico, como maior produção de esporos que poderia resultar em maior quantidade de inóculo deste genótipo na atmosfera. Na verdade, estudo em ambiente controlado mostrou que a produção de peritécios e liberação de ascósporos em colmos de milho foi similar entre estes dois genótipos (Spolti *et al.*, 2014a). Nossos resultados levam a concluir que diferenças na frequência dos genótipos tricotecenos amostrados em diferentes habitats são influenciados pela presença de outras espécies do complexo *F. graminearum* (Boutigny *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2015), e que o genótipo tricoteceno não representa uma vantagem adaptativa na sobrevivência do fungo ou durante a fase patogênica.

O fungo *F. graminearum* sobrevive saprofiticamente nos colmos de milho em decomposição, sendo estes restos culturais a principal fonte de inóculo para epidemias de giberela, tanto em trigo, quanto milho (Sutton, 1982; Pereyra *et al.*, 2004; Pereyra &

Dill-Macky, 2008; Landschoot *et al.*, 2011). Juntos, os resultados apresentados por Boutigny *et al.* (2011) e Del Ponte *et al.* (2015) com os resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que o efeito do inóculo local na intensidade das epidemias de giberela podem ser mais importante nos EUA que em outros locais (exemplo África do Sul e Brasil) devido ao aparente contínuo (Bousset & Chèvre, 2012) na população de *F. graminearum* dos colmos de milho e dos grãos nos EUA, diferente do citado por Boutigny *et al.* (2011) e Del Ponte *et al.* (2015). No entanto, a relativa contribuição do inóculo local versus inóculo externo ainda não está completamente elucidada. Estudo sobre diferentes fontes de inóculo observou associação entre alta intensidade de giberela em trigo quando este sucedia a cultura do milho do que quando sucedia a soja (Dill-Macky & Jones, 2000). Sistemas de semeadura direta e cultivo mínimo tem aumentando nas últimas décadas, promovendo o incremento dos restos culturais pela menor taxa de decomposição e aumentando a disponibilidade de inóculo de *F. graminearum*. Além disto, estudos reportando que o incremento da quantidade de restos culturais de milho podem influenciar positivamente na capacidade de disseminação (Keller *et al.*, 2011), e que inóculo viável de *F. graminearum* foi encontrado de 750 m até mais de quilômetros de distância da fonte de inóculo (Prussin *et al.*, 2014), sugerem que pode ser difícil prever o impacto dos restos culturais de milho nas epidemias de giberela em trigo nos EUA (Shah *et al.*, 2014).

Os locais amostrados diferiram em ambiente e sistemas de cultivo. Enquanto em Aurora e Belmont são regiões mais quentes com grandes áreas de cultivo de milho e trigo cultivado em rotação com outras culturas. Willsboro está localizada em uma região de vale, fria e com poucas áreas agrícolas distribuídas entre as montanhas de Adirondack e o lago Champlain. Tais diferenças entre locais podem influenciar a composição dos genótipos tricotecenos. De fato, o predomínio dos isolados 15-ADON

em grãos de trigo e milho em Aurora e Belmont foi consistente com outra de grãos de trigo nestas regiões em 2007 e 2011. A proporção similar entre isolados 3-ADON e 15-ADON em Willsboro também é coerente com coletas anteriores onde frequências acima de 30% do genótipo 3-ADON tem sido observadas nessa região noroeste do Estado de New York e no Estado de Vermont. Estudos prévios tem reportado um incremento na prevalência do genótipo 3-ADON em grãos de trigo no sentido oeste-leste no Canadá (Guo *et al.*, 2008), e uma tendência a uma maior frequência no sentido Carolina do Norte (sul) para New York (Norte) nos EUA (Schmale *et al.*, 2011b). Em Willsboro, as montanhas de Adirondack e o lago Champlain podem talvez atuar como barreiras físicas para a propagação de uma população introduzida e estejam envolvidas nas frequências mais altas do genótipo 3-ADON observadas nesta região.

Fatores climáticos tem sido reportados associados com as frequências dos genótipos 3-ADON e 15-ADON das espécies do complexo *F. graminearum* em trigo e milho. Na China, isolados 3-ADON foram encontrados em frequências mais elevadas em grãos de trigo em regiões de clima quente no vale do rio Yangtze, enquanto isolados 15-ADON predominavam na população em regiões de clima frio no sul da China (Ji *et al.*, 2007; Ndoye *et al.*, 2012). No sul do Brasil, espécies do complexo possuindo o genótipo 3-ADON foram encontrados predominantemente em regiões de elevação (frias), enquanto 15-ADON, o genótipo predominante (>90%) foi encontrado em todas as regiões amostradas (Del Ponte *et al.*, 2015). As espécies do complexo *F. graminearum* nestas regiões diferem da América do Norte, onde *F. graminearum* aparece como a espécie dominante (Starkey *et al.*, 2007; Schmale *et al.*, 2011b), enquanto no primeiro estudo *F. asiaticum* e *F. graminearum* são as prevalentes, no segundo, embora não os únicos, *F. graminearum* e *F. meridionale* predominaram.

Nós não observamos evidências de seleção por hospedeiro pelo genótipo tricoteceno, visto que as frequências entre grãos de trigo e milho não diferiram em nenhum dos locais amostrados. Enquanto DON tem sido reportado como um fator de agressividade em espigas de trigo e milho (Harris & Desjardins, 1999; Bai *et al.*, 2002), estudos prévios comparando diferentes tipos de tricotecenos com relação ao fator de agressividade em trigo tem sido contraditórios. Em um estudo com uma coleção de isolados com diferentes espécies do complexo *F. graminearum*, foi sugerido que o total de tricoteceno produzido e não o tipo de tricoteceno (DON ou NIV) produzido que afeta a agressividade do isolado em trigo (Goswami & Kistler, 2005). Além disto, em ambos genótipos, 3-ADON (Gilbert *et al.*, 2010) e 15-ADON (Foroud *et al.*, 2012), tem sido reportado isolados agressivos e causando elevadas severidades de giberela. Contraditoriamente, o efeito dos tipos de tricoteceno na agressividade de isolados em espigas de milho permanece incerto. No entanto, regiões onde os genótipos DON e NIV coexistem, amostragens em grãos de milho na América do Sul (Sampietro *et al.*, 2011), África (Desjardins *et al.*, 2008), Ásia (Ndoye *et al.*, 2012) e Europa (Logrieco *et al.*, 2002) o genótipo NIV é mais frequente detectado e não é incomum ser o prevalente. Porém novamente as populações patogênicas nestas regiões são compostas por múltiplas espécies do complexo *F. graminearum* (Lee *et al.*, 2010; Desjardins & Proctor, 2011; Sampietro *et al.*, 2011; Boutigny *et al.*, 2011). As razões para tais diferenças na distribuição geográfica dos genótipos tricotecenos ao redor do mundo não estão totalmente claras, mas tem sido sugerido que condições ambientais, ecológicas e/ou seleção por hospedeiro entre espécies do complexo *F. graminearum*, e *fitness* adaptativo podem ser fatores chaves (Ward *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Boutigny *et al.*, 2011; Backhouse, 2014). Nossos estudos sugerem que são as espécies do complexo

e não o genótipo tricoteceno que desempenham um papel importante na adaptação ao habitat ecológico e preferência do hospedeiro.

Em resumo, conduziu-se uma amostragem intensiva de isolados (1.407) obtidos de quatro habitats incluindo colmos de milho, ar acima do dossel, grãos de trigo e de milho em três diferentes agro-ecossistemas, fornecendo uma reportagem detalhada dos genótipos tricotecenos em diferentes estágios do ciclo biológico de *F. graminearum* na região leste dos EUA. Pelo menos do ponto de vista dos genótipos tricotecenos, as populações locais de *F. graminearum* parecem não ser estruturadas pelos quatro habitats analisados e isolados 15-ADON foram a grande maioria (88%) da população, mas as frequências dos genótipos podem variar de acordo com a região amostrada. Nós não encontramos isolados do genótipo NIV e isolados NIV tem sido ausentes ou aparecem em baixas frequências na maioria dos levantamentos conduzidos na América do Norte (Campbell *et al.*, 2002; Starkey *et al.*, 2007; Schmale *et al.*, 2011b). Porém elevada proporção (79%) do genótipo NIV foi encontrada em pequenas regiões produtoras de trigo do sul da Louisiana (Gale *et al.*, 2007). Diante disto, futuras amostragens em diferentes regiões do leste dos EUA e em diferentes habitats serão importantes para detecção precoce de alterações na frequência e distribuição dos genótipos tricotecenos que podem influenciar as populações patogênicas em trigo e milho, como resultado de introdução transcontinental (Ward *et al.*, 2008).

4.3 Estudo 3: Agressividade e perfil toxigênico de *Fusarium graminearum* de milho e trigo inoculados em ambos hospedeiros.

4.3.1 Resultados

4.3.1.1 Agressividade e produção de micotoxinas em trigo

A severidade média de giberela diferiu entre os isolados avaliados ($P < 0,001$), variando de 26,6% até 62,9% (Figura 13A). Quando os grupos de isolados foram contrastados, não houve diferença significativa entre a severidade média de giberela dos isolados oriundos de trigo dos isolados oriundos do milho ($P = 0,140$) e também não diferiram os isolados 3-ADON dos isolados 15-ADON ($P = 0,132$) (Figura 13A). Com exceção de um isolado (Gz830), todos os isolados produziram principalmente DON com níveis variando de 10,65 $\mu\text{g/g}$ até 97,05 $\mu\text{g/g}$ (Figura 14A) e pequenas quantidades da forma acetilada de DON predita pelo PCR (Figura 15), genótipos 15-ADON e 3-ADON produziram principalmente DON/15-ADON e DON/3-ADON, respectivamente (Figura 14A). Alguns isolados 15-ADON também produziram traços da forma acetilada 3-ADON (Figura 14A). A média de tricotecenos total (DON + acetilados) não diferiu significativamente ($P = 0,678$) entre isolados oriundos do trigo (60,1 $\mu\text{g/g}$) e milho (39,2 $\mu\text{g/g}$) e entre isolados 3-ADON (53,1 $\mu\text{g/g}$) e 15-ADON (47,6 $\mu\text{g/g}$) (Figura 14A). Nenhum isolados produziu quantidades detectáveis de ZEA (Figura 14A).

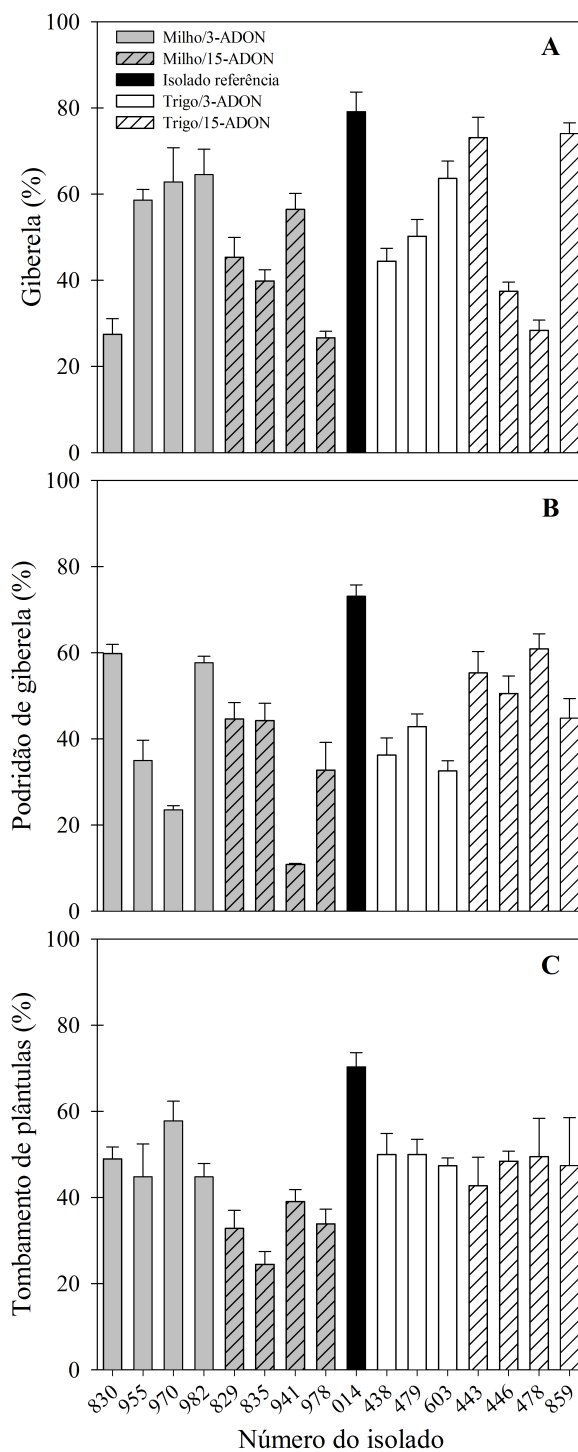


FIGURA 13. Severidade de giberela em trigo (A), de podridão de giberela em milho (B), e incidência de tombamento de plântulas de milho (C) causadas por 16 isolados de *Fusarium graminearum* oriundos de espigas de trigo ou milho e do genótipo 3-acetyl(A)deoxivalenol(DON) ou 15-ADON.

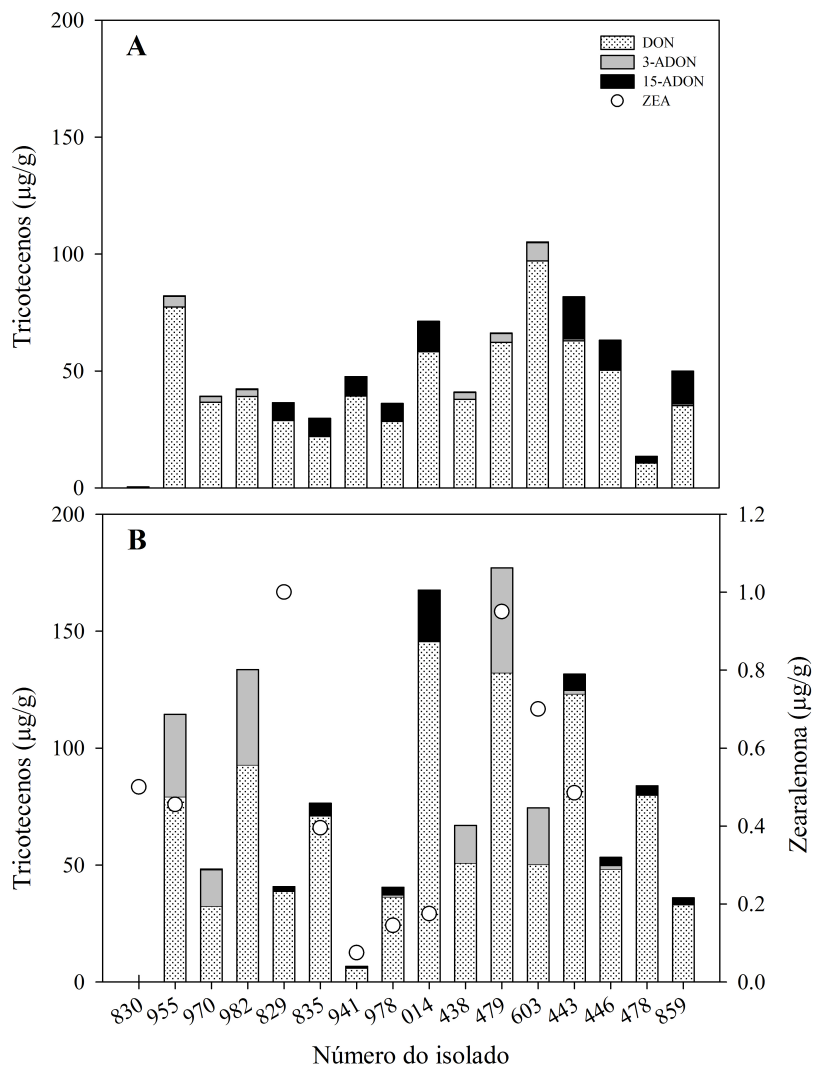


FIGURA 14. Produção de DON, formas acetiladas e ZEA em grão de trigo (A) e grãos de milho (B) de 16 isolados de *Fusarium graminearum* oriundos de espigas de trigo ou milho e do genótipo 3-acetyl(A)deoxivalenol(DON) ou 15-ADON.

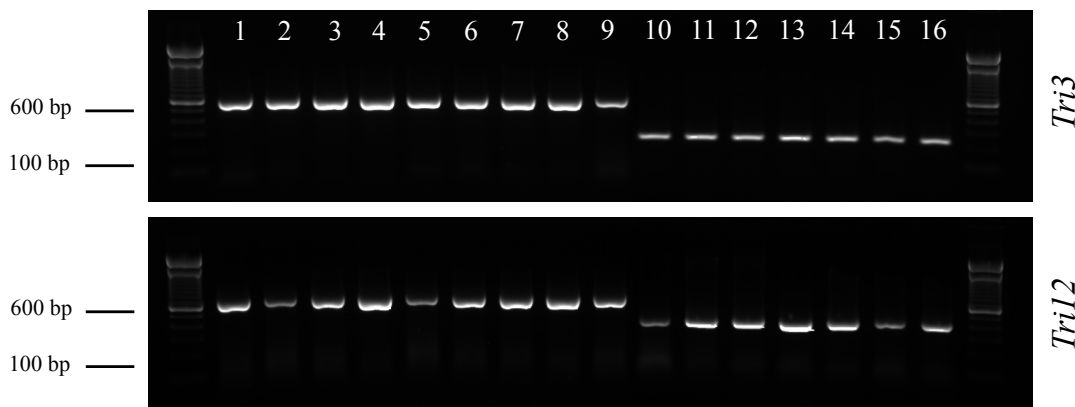


FIGURA 15. Gel de agarose 1% mostrando os amplicons dos genes *Tri3* (acima) e *Tri12* (abaixo) dos genótipos tricotecenos dos 16 isolados de *Fusarium graminearum*. Para *Tri3*, produtos da PCR apresentam tamanho de 610 e 243 pb para os genótipos 15-ADON e 3-ADON, respectivamente. Para *Tri12*, produtos da PCR apresentam tamanho de 670 and 410 pb para os genótipos 15-ADON e 3-ADON, respectivamente. Representantes dos genótipos 15-ADON (linhas 1–9) e 3-ADON (linhas 10–16). Marcadores com tamanho de 100 pb.

4.3.1.2 Agressividade e produção de micotoxinas em milho

Nos ensaio de campo de milho, todos os isolados produziram sintomas típicos de giberela com severidade variando significativamente entre os isolados ($P < 0,001$), com a maior severidade média (73%) para o isolado referência (Gz014) (Figura 13B). A severidade média de giberela não diferiu significativamente entre isolados agrupados pelo hospedeiro de origem ($P = 0,081$) e pelo genótipo tricoteceno ($P = 0,644$) (Figura 13B).

Devido a ampla variabilidade nos níveis de DON entre isolados do mesmo hospedeiro de origem, não foi encontrado diferença significativa ($P = 0,054$) na média de DON entre os dois grupos. Embora apenas marginalmente não significativo ($P = 0,054$), isolados oriundos do trigo (73,96 $\mu\text{g/g}$) produziram em média 30 $\mu\text{g/g}$ de DON a mais que os isolados oriundos do milho (44,57 $\mu\text{g/g}$) (Figura 14B). Novamente, com exceção do isolado Gz830, todos os isolados produziram DON como principal toxina nos grão de milho, com níveis variando de 5,9 $\mu\text{g/g}$ até 132,2 $\mu\text{g/g}$ e também baixas

concentrações de 3-ADON ou 15-ADON, dependendo do genótipo tricoteceno (Figura 14B). Alguns isolados 3-ADON produziram elevadas concentrações da forma acetilada do que isolados 15-ADON (Figura 14B), mas não foi detectada diferença significativa entre os dois grupos tricotecenos ($P = 0,431$). Quatro isolados 3-ADON e cinco 15-ADON, além do isolado referência (Gz014), produziram similar ($P = 0,561$) quantidades de ZEA, variando de $0,08 \mu\text{g/g}$ à $1,0 \mu\text{g/g}$ (Figura 14B). Não foi observado diferença ($P > 0,05$) nas concentrações de ZEA entre estes dois grupos.

A pesar de diferenças entre o hospedeiro de origem e genótipo tricoteceno dos isolados, foi observado uma correlação positiva e significativa entre o total de tricoteceno e severidade de giberela em trigo ($r = 0,64$; $P = 0,011$) e milho ($r = 0,52$, $P = 0,057$) (Figura 16).

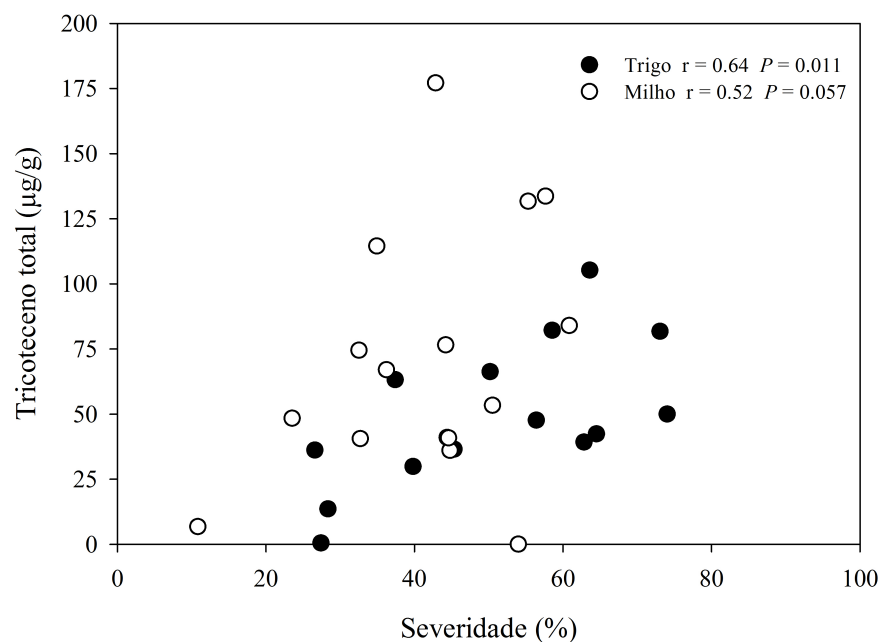


FIGURA 16. Correlação entre tricotecenos total e severidade de giberela em trigo (pontos pretos) e milho (pontos brancos).

4.3.1.3 Tombamento de plântulas de milho

As inoculações resultaram em altos níveis de infestação (100%) e infecção (>90%) de sementes em todos os isolados sem aparente efeito negativo na taxa de germinação de sementes. A incidência de tombamento não diferiu ($P = 0,098$) entre isolado oriundos do trigo (48%) e oriundos do milho (40%) (Figura 13C). Não foi encontrado diferença significativa ($P = 0,079$) entre isolados 3-ADON e 15-ADON na incidência de tombamento de plântulas, variando esta entre 25% à 58% (Figura 13C). Além disto, não foi observado diferença significativa ($P > 0,05$) entre todas as variáveis relacionadas a redução do crescimento da planta. Em média, redução no comprimento de parte aérea e raiz, e peso seco de parte aérea e raiz foram 42%, 18%, 57% e 62% respectivamente (Figura 17).

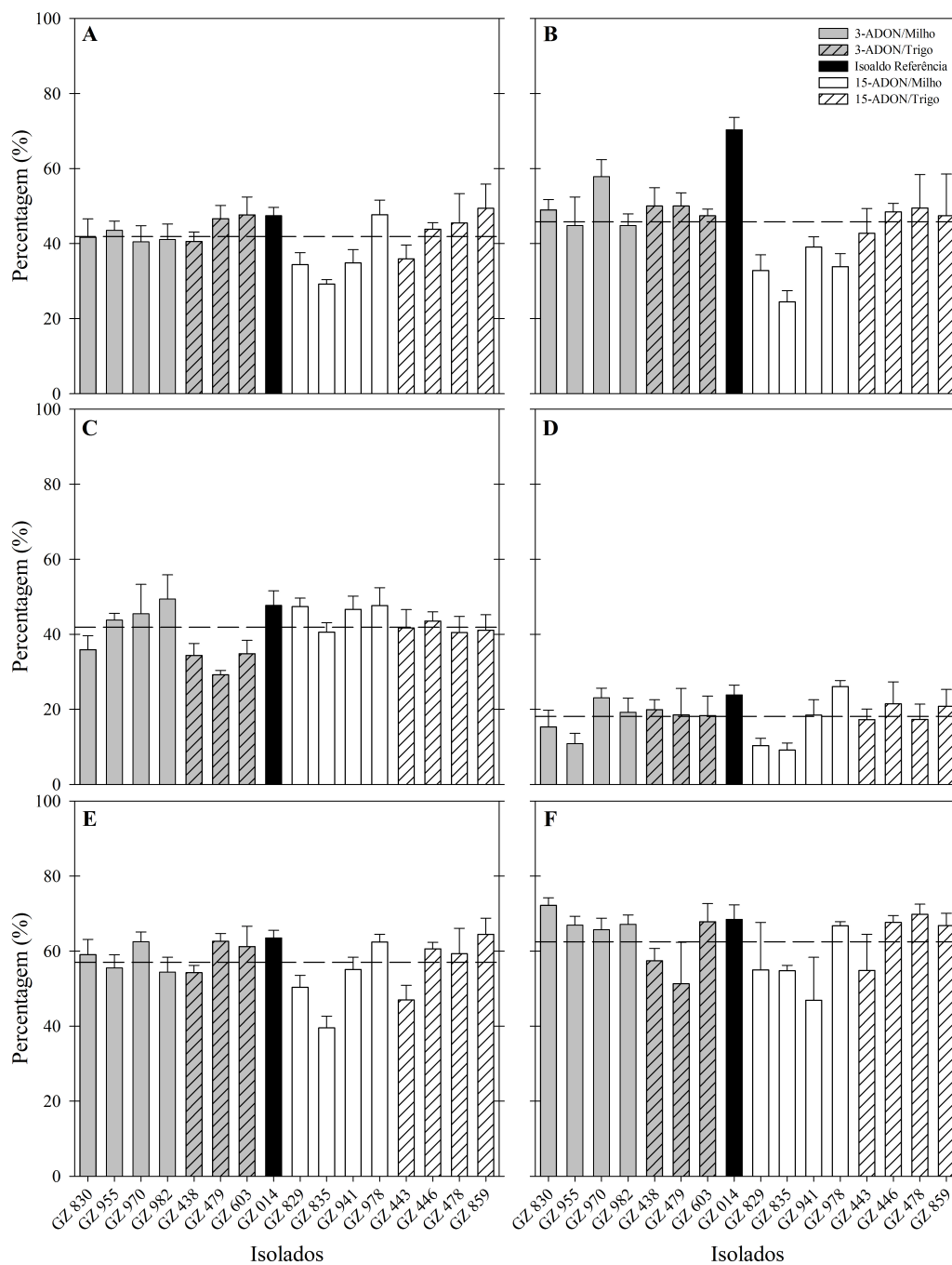


FIGURA 17. Características patogênicas de 16 isolados de *Fusarium graminearum* oriundos de espigas de trigo ou milho e do genótipo 3-acetyl(A)deoxivalenol(DON) ou 15-ADON. Redução da emergência (A), incidência de tombamento de plântulas (B), redução do comprimento de parte aérea (C), de raiz (D), de peso de parte aérea (E), e peso de raiz (F) aos 14 dias após o semeadura.

4.3.2 Discussão

Não foi encontrada evidência de preferência por hospedeiro em nenhum dos grupos baseados nas medidas de agressividade. Apesar de não significativo, foi observado uma tendência dos isolados oriundos do trigo de serem mais agressivos e produzirem mais DON do que os isolados oriundos do milho, e, em geral, apresentarem elevados valores de intensidade de doença nas três variáveis analisadas. Agressividade é considerado um parâmetro complexo, mesmo assim específicos genes e genes de efeito quantitativo (QTL, do inglês quantitative trait loci) vem sendo relacionados a agressividade de *F. graminearum* (Cumagun *et al.*, 2004a). Interações específicas entre hospedeiro-isolado podem direcionar populações de *F. graminearum* à se adaptar ao aumento da resistência do hospedeiro (Cumagun *et al.*, 2004b; Talas *et al.*, 2012). Voss *et al.* (2010) estudando a variação e segregação da agressividade entre a progênie de *F. graminearum* gerada a partir de cruzamento entre parentais altamente agressivos sugere que um incremento na resistência a doenças, também pode resultar em um aumento na agressividade na população do patógeno. Diversos QTL tem sido identificados relacionados com a resistência do trigo a giberela, destacadamente o gene *Fhb1* (20 à 40% da variação fenotípica nos mapas populacionais), o qual é rotineiramente usado em programas de melhoramento no EUA e Canadá (Miedaner & Korzun, 2012). Por outro lado, a resistência a giberela em milho é menos entendida, e apenas dois QTL são conhecidos por apresentar algum efeito (Mesterházy *et al.*, 2012). A alta pressão de seleção imposta pelo melhoramento com aumento da resistência a giberela por apenas alguns QTL pode selecionar para populações do patógeno mais agressivas ou com maior capacidade de produção de micotoxinas. Esta seleção direcionada pode não ser observada em um curto prazo (Voss *et al.*, 2010), porém a longo prazo, populações de *F. graminearum* com maior agressividade e capacidade de

produção de micotoxinas podem ocorrer em resposta a resistência do hospedeiro (Cumagun & Miedaner, 2004).

Nossos resultados sugerem que um isolado agressivo em um hospedeiro/órgão pode não ser tão agressivo em outro hospedeiro/órgão. Entretanto, mesmo que em diferente hospedeiro, foi reportado que *F. graminearum* possui fatores de virulência que são comuns a giberela em trigo e morte de plântulas em soja (Sella *et al.*, 2014). O fato de compartilhar fatores de virulência em culturas que são utilizadas em sistemas de sucessão/rotação pode estar envolvido no aumento da ocorrência de morte de plântulas de soja causadas por *F. graminearum* recentemente em algumas partes da América do Sul e Norte (Barros *et al.*, 2013; Arias *et al.*, 2013b). Estudo com mais de 100 isolados de *F. graminearum* recuperados de sementes de milho e soja em 13 regiões do estado de Ohio encontrou que todos os isolados foram agressivos em sementes de milho, porém moderadamente agressivos em sementes de soja (Broders *et al.*, 2007). Futuras pesquisas fazem-se necessárias para melhor entender a influencia da rotação de culturas destas três culturas agrícolas na ecologia e epidemiologia de *F. graminearum*.

Neste estudo, os isolados de *F. graminearum* obtidos em New York mostraram variação na agressividade tanto em trigo quanto em milho e não puderam ser estruturados pelo quimiotipo, corroborando com resultados anteriores em agressividade em espigas de trigo (Goswami & Kistler, 2005; Gilbert *et al.*, 2010; Purahong *et al.*, 2014; Spolti *et al.*, 2014a), espigas de milho (Munkvold & O'Mara, 2002; Miedaner *et al.*, 2010) e em sementes (Kuhnem Júnior *et al.*, 2013; Sella *et al.*, 2014). Nossos resultados são consistentes com uma larga coleção (50 isolados) de *F. graminearum* isolados de espigas de trigo em New York, onde isolados 3-ADON não apresentaram nenhuma vantagem no fitness em relação a isolados 15-ADON (Spolti *et al.*, 2014a). Da mesma forma, isolados de *F. graminearum* inoculados em espigas de linhagens de

milho mostraram variação na severidade de doença na espiga e não puderam ser discriminados pelo quimiotipo (Miedaner *et al.*, 2010). Contrariamente, estudos com isolados de *F. graminearum* de alguns regiões dos EUA e Canadá mostraram que isolados 3-ADON foram mais agressivos em espigas de trigo que isolados 15-ADON (Puri & Zhong, 2010; Foroud *et al.*, 2012). Recombinação sexual entre e dentro dos genótipos tricotecenos tem sido documentados (Bowden & Leslie, 1999; Chen & Zhou, 2009), logo troca de material genético entre populações podem ocorrer e genes que conferiam algum tipo de vantagem adaptativa a um grupo agora podem estar presentes em ambos genótipos tricotecenos. No entanto, Ward *et al.* (2008) sugerem que isolados 3-ADON na América do Norte são resultados de uma introdução transcontinental da Europa, e que estas duas populações (3-ADON e 15-ADON) tem sido simpátricas por um período curto de tempo para permitir uma troca genética capaz de quebrar a estrutura populacional.

Também foi observado ampla variação na produção de DON entre os isolados independente do seus genótipos tricotecenos. Estudos anteriores comparando produção de DON e quimiotipos tem sido contraditórios, e isolados 3-ADON tem sido reportados sendo (Ward *et al.*, 2008; Puri & Zhong, 2010) ou não (Gilbert *et al.*, 2010; Spolti *et al.*, 2014a) produtores de maiores concentrações de DON que isolados 15-ADON. A habilidade de isolados de *F. graminearum* em produzir grandes quantidades de DON tem sido associada com a agressividade (Mesterházy, 2002). Em um estudo com uma coleção de isolados de *F. graminearum* de diferentes espécies do complexo, sugere que é o total de tricoteceno e não o tipo de tricoteceno (DON ou NIV) que afeta a agressividade do isolado em trigo (Goswami & Kistler, 2005). No nosso estudo, o total de tricoteceno, quando somados DON e as formas acetiladas, teve significativa associação com a severidade de giberela tanto em trigo quanto em milho, corroborando

com estudos prévios em trigo e milho (Lemmens *et al.*, 2004; Goswami & Kistler, 2005; Jin *et al.*, 2014). Entretanto, Lemmens *et al.* (2004) observaram que a correlação entre os sintomas de giberela e a quantidade de DON decrescem em espigas de trigo com elevados níveis de infecção. Também, ampla variabilidade com relação entre DON e intensidade de giberela foi encontrado em um estudo com metanálise de 126 campos de trigo no EUA e Canadá. Os autores sugeriram que tal variabilidade pode ser atribuída a diversos fatores que também influenciam esta relação, com por exemplo: diferentes capacidade de produção de DON entre isolados de *F. graminearum*, reação de resistência a giberela e acumulação de DON diferenciada entre cultivares e condições climáticas favoráveis para infecção e crescimento do fungo (Paul *et al.*, 2006).

Com exceção de um isolado (Gz830), todos os isolados produziram DON como principal toxina e baixas quantidades das suas respectivas formas acetiladas em trigo e milho. Estudos tem demonstrado que as baixas concentrações das formas acetiladas de DON em grãos inoculados tenha relação com a remoção do acetil em planta e posterior conversão de 3 e 15-ADON em DON (Burlakoti *et al.*, 2008a). Além disto, os níveis de DON encontrados, mesmo nos isolados menos agressivos, excedeu em mais de 10x o limite máximo tolerável para consumo humano (Anvisa, 2011), assim com observado em plantas inoculadas e mantidas em condições ótimas ao crescimento e desenvolvimento da doença (Spolti *et al.*, 2014a).

Mesmo DON sendo relatada como sendo um fator de virulência em trigo e milho (Harris & Desjardins, 1999; Bai *et al.*, 2002), foi observado um isolado (GZ830) do genótipo 3-ADON que não produziu DON ou forma acetilada tanto nos grãos de trigo quanto nos de milho, entretanto ainda mostrou-se agressivo em ambos hospedeiros. A produção de toxinas pelos fungos é resultante de complexas interações

entre patógeno e hospedeiro, sendo influenciada por diversos fatores (Mesterházy, 2002; Lemmens *et al.*, 2004; Cowger *et al.*, 2009; Yoshida & Nakajima, 2010). A descoberta de um isolado naturalmente não produtor de micotoxina pode se mostrar útil para futuras pesquisas que visem melhor entender as bases genéticas que regulam a produção de tricotecenos e sua relação com a agressividade (Desjardins *et al.*, 1993).

Foi observado que aproximadamente 65% dos isolados produziram pequenas quantidades de ZEA, um estrogênico composto responsável por distúrbios hormonais em animais e humanos, e também pode contribuir na patogênese vegetal (Yazar & Omurtag, 2008; Repka *et al.*, 2013). Esta toxina foi detectada apenas nos grãos de milho, não sendo detectada em grãos de trigo, talvez devido a mecanismos de detoxificação desta espécie vegetal (Desjardins, 2006).

Como esperado, isolados 3-ADON e 15-ADON produziram maiores quantidades da sua forma acetilada correspondente com o seu genótipo, respectivamente, em grãos de ambos hospedeiros. Porém traços da outra forma acetilada também foram detectados em quase todos os isolados. Quando culturas de *F. graminearum* cultivados em meios *in vitro* são observadas misturas de DON e suas formas acetiladas em elevadas proporções (Alexander *et al.*, 2011). Na verdade, tem sido demonstrada a falta de correlação entre produção de DON *in vitro* e *in planta* (espigas de trigo inoculadas) (Walker *et al.*, 2001). Similarmente, isolados patogênicos de *F. graminearum* foram capazes de causar giberela em espigas de trigo e panículas de arroz, enquanto DON e NIV foram produzidos apenas em espigas de trigo (Goswami & Kistler, 2005), consistente com relatos de que a produção de micotoxinas em culturas autoclavadas de arroz talvez não reproduzam as condições em *in planta* (Leslie & Summerell, 2006; Burlakoti *et al.*, 2008b).

Em resumo, os isolados de *F. graminearum* do estado de New York mostraram variação na agressividade e produção de micotoxinas em plantas de trigo e milho. Não foi possível separar os isolados em grupos, quer seja pelo hospedeiro de origem, quer seja pelo genótipo tricoteceno. Embora não significativo ($P = 0,05$), isolados oriundos do trigo, em média, foram mais agressivos e toxigênicos em espigas dos dois hospedeiros, sugerindo que a habilidade patogênica entre isolados de oriundos de trigo e milho deve ser testada com um número amostral maior de ambos hospedeiros. Nossos resultados na variabilidade do patógeno suportam a estratégia da necessidade de caracterizar os isolados antes de sua utilização e deve-se utilizar isolados caracterizados para o determinado hospedeiro como agressivos e toxigênicos específicos em estudos de reação de resistência de genótipos.

5 CONCLUSÕES

No Brasil, existe diversidade no complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC) associados à colmos de milho em decomposição nas lavouras do noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, com a co-ocorrência de espécies com diferentes potenciais toxigênicos.

A maior prevalência e frequência da espécie *F. meridionale*, bem como o predomínio do genótipo NIV, nos colmos de milho em decomposição, aliada a maior plasticidade desta espécie em resposta a temperatura indicam uma vantagem de *F. meridionale* na fase saprofítica, a qual pode constituir a principal espécie presente no ambiente para infecções em espigas de milho no Estado do Rio Grande do Sul.

No estado americano de Nova York, a população de *F. graminearum* em agroecossistemas de trigo e milho predomina do genótipo 15-ADON, independente da fase do ciclo de vida do fungo.

Pelo menos do ponto de vista dos genótipos tricotecenos, as populações locais de *F. graminearum* em Nova York parecem não ser estruturadas pelos habitats analisados, incluindo as fases patogênicas e saprofíticas do ciclo de vida do fungo.

Populações regionais em Nova York do patógeno separados por menos de 400 km diferiram significativamente na frequência do genótipo tricoteceno sugerindo que

as populações regionais podem ser diferenciadas com base na seleção associada ao clima ou sistemas de cultivo ainda não identificados.

A variação na agressividade e produção de micotoxinas dos isolados de *F. graminearum* em plantas de trigo e milho não permitiu a separação dos isolados em grupos, nem pelo hospedeiro de origem, nem pelo genótipo tricoteceno.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, N. J. *et al.* The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, San Diego, v. 48, n. 5, p. 485–495, 2011.

ANVISA. Resolução RDC 7. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos., constante do Anexo desta Resolução. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, de 26 de fevereiro de 2011. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/media/IN07-2011-Ocratoxina.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2011.

AOKI, T. *et al.* Systematics, Phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* Head Blight cereal pathogens. **Mycotoxins**, Geneva, v. 62, n. 2, p. 91–102, 2012.

AOKI, T.; O'DONNELL, K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. **Mycologia**, New York, v. 91, n. 4, p. 597–609, 1999.

ARIAS, M. M. D. *et al.* Distribution and Frequency of *Fusarium* Species Associated with Soybean Roots in Iowa. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 97, n. 12, p. 1557–1562, 2013.

ARIAS, M. M. D.; LEANDRO, L. F.; MUNKVOLD, G. P. Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybeans. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 103, n. 8, p. 822–832, 2013.

ASTOLFI, P. *et al.* Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in southern Brazil. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, 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**, Dordrecht, v. 139, n. 1, p. 161–173, 2014.

BAI, G. H.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 153, n. 2, p. 91–98, 2002.

BARROS, G. G. *et al.* Pathogenicity of phylogenetic species in the *Fusarium graminearum* complex on soybean seedlings in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 138, n. 2, p. 215–222, 2013.

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

BOUSSET, L.; CHÈVRE, A.M. Controlling cyclic epidemics on the crops of the agroecosystems: articulate all the dimensions in the formalisation, but look for a local solution. **Journal of Botany**, London, v. 20, n. 3, p. 1–9, 2012.

BOUTIGNY, A.L. *et al.* Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. **Fungal genetics and biology : FG & B**, San Diego, v. 48, n. 9, p. 914–920, 2011.

BOUTIGNY, A.L. *et al.* Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 138, n. 1, p. 133–148, 2013.

BOWDEN, R. L.; LESLIE, J. F. Sexual Recombination in *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 89, n. 2, p. 182–188, 1999.

BRODERS, K. D. *et al.* Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 91, n. 9, p. 1155–1160, 2007.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 16 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 95–101, 2007.

BURLAKOTI, R. *et al.* Genetic relationships among populations of *Gibberella zeae* from barley, wheat, potato, and sugar beet in the upper midwest of the United States. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 98, n. 9, p. 969–976, 2008a.

BURLAKOTI, R. *et al.* Comparative mycotoxin profiles of *Gibberella zeae* populations from barley, wheat, potatoes, and sugar beets. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 74, n. 21, p. 6513–6520, 2008b.

CALORI-DOMINGUES, M. A. *et al.* Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 181–185, 2007.

CAMPBELL, H. *et al.* Comparison of mycotoxin profiles among cereal samples from eastern Canada. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 80, n. 5, p. 526–532, 2002.

CARTER, J. *et al.* Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 6, p. 573–583, 2002.

CARTER, J. P. *et al.* Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. **Plant Pathology**, [Oxford], v. 49, n. 4, p. 452–460, 2000.

CASA, R. T. *et al.* **Doenças do Milho**: guia de campo para identificação e controle. Lages, SC: Graphel, 2010. v. 1, p. 82

CHEN, Y.; ZHOU, M. G. Characterization of *Fusarium graminearum* isolates resistant to both carbendazim and a new fungicide JS399-19. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 99, n. 4, p. 441–446, 2009.

CLEAR, R. M. *et al.* Deoxynivalenol levels and chemotype frequency in barley cultivars inoculated with two chemotypes of *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 35, n. 1, p. 37–45, 2013.

CONAB. **Levantamento de safras de 2014/2015**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_07_09_09_36_57_10_levantamento_de_graos_julho_2014.pdf. Acesso em: 10 dez. 2014.

COWGER, C. *et al.* Post-anthesis moisture increased *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 99, n. 4, p. 320–327, 2009.

CRANE, J. M. *et al.* Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of *Fusarium* head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 103, n. 2, p. 146–155, 2013.

CUMAGUN, C. J. R. *et al.* Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 94, n. 5, p. 520–526, 2004.

CUMAGUN, C. J. R.; MIEDANER, T. Segregation for aggressiveness and deoxynivalenol production of a population of *Gibberella zeae* causing head blight of wheat. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 8, p. 789–799, 2004.

CUMAGUN, C. J. R.; RABENSTEIN, F.; MIEDANER, T. Genetic variation and covariation for aggressiveness, deoxynivalenol production and fungal colonization among progeny of *Gibberella zeae* in wheat. **Plant Pathology**, [Oxford], v. 53, n. 4, p. 446–453, 2004.

DEL PONTE, E. *et al.* Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 105, n. 2, p. 246–254, 2015.

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**, Berlin, v. 155, n. 10, p. 577–581, 2007.

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.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, Easton, v. 132, n. 2, p. 1087–1091, 2012.

DESJARDINS, A. **Fusarium Mycotoxins: chemistry, genetics, and biology**. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 2006. 268 p.

DESJARDINS, A. E. *et al.* Reduce virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field test. **Molecular Plant-Microbe interactions**, Sant Paul, v. 9, n. 9, p. 775–781, 1996.

DESJARDINS, A. E. *et al.* Gibberella ear rot of maize (*Zea mays*) in Nepal: distribution of the mycotoxins nivalenol and deoxynivalenol in naturally and experimentally infected maize. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 56, n. 13, p. 5428–5436, 2008.

DESJARDINS, A. E. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 56, n. 17, p. 7587–7592, 2008.

DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 57, n. 3, p. 595–604, 1993.

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 2, p. 47–50, 2007.

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. **Fungal biology**, Oxford, v. 115, n. 1, p. 38–48, 2011.

DILL-MACKY, R.; JONES, R. K. The Effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 84, n. 1, p. 71–76, 2000.

DOOHAN, F. M. *et al.* Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of Tri5 by *Fusarium* species in vitro and in planta. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 3850–3854, 1999.

EMBRAPA (Ed.). **Cultivo do Milho**. 2010 (Sistemas de Produção, 1). Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm. Acesso em: 20 mar. 2014.

ENGLE, J.; MADDEN, L.; LIPPS, P. Evaluation of inoculation methods to determine resistance reactions of wheat to *Fusarium graminearum*. **Plant disease**, Sant Paul, v. 87, n. 12, p. 1530–1535, 2003.

FERNANDEZ, M. R.; TURKINGTON, T. K.; MAY, W. E. Effectiveness of fungicide seed treatments for preventing seed-to-seedling transmission of *Fusarium graminearum* under controlled-environment conditions. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, p. 811–821, 2009.

FOROUD, N. A. *et al.* Greenhouse studies reveal increased aggressiveness of emergent canadian *Fusarium graminearum* chemotypes in wheat. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 96, n. 9, p. 1271–1279, 2012.

FRANCIS, R. G.; BURGESS, L. W. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* “*graminearum*” in eastern Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 68, p. 421–427, 1977.

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.* Chromosome complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. **Genetics**, Bethesda, v. 171, n. 3, p. 985–1001, 2005.

GALE, L. R. *et al.* Population subdivision of *Fusarium graminearum* sensu stricto in the upper midwestern united states. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 97, n. 11, p. 1434–1439, 2007.

GALE, L. R. *et al.* Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in southern louisiana. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 101, n. 1, p. 124–134, 2011.

GEISER, D. M. *et al.* FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 473–479, 2004.

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

GILBERT, J. *et al.* Relative aggressiveness and production of 3- or 15-acetyl deoxynivalenol and deoxynivalenol by *Fusarium graminearum* in spring wheat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 32, n. 2, p. 146–152, 2010.

GILBERT, J. *et al.* Ratio of 3-ADON and 15-ADON isolates of *Fusarium graminearum* recovered from wheat kernels in Manitoba from 2008 to 2012. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 36, n. 1, p. 54–63, 2014.

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. 149–174, 2013.

GILBERT, J.; WOODS, S. M.; KROMER, U. Germination of ascospores of *Gibberella zeae* after exposure to various levels of relative humidity and temperature. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 98, n. 5, p. 504–508, 2008.

GOMES, L. B. *et al.* Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. **Plant Pathology**, [Oxford], 2015. DOI: 10.1111/ppa.12332. Disponível em: <http://http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12332/pdf>. Acesso em: 05 dez. 2014.

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**, Sant Paul, v. 95, n. 12, p. 1397–1404, 2005.

GUO, X.; FERNANDO, W.; SEOW-BROCK, H. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 92, n. 5, p. 756–762, 2008.

HARRIS, L.; DESJARDINS, A. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 83, n. 10, p. 954–960, 1999.

INCH, S. A.; GILBERT, J. Survival of *Gibberella zeae* in Fusarium-Damaged Wheat Kernels. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 87, n. 3, p. 282–287, 2003.

JANSEN, C. *et al.* Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 46, p. 16892–16897, 2005.

Ji, L. *et al.* Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol Chemotypes of *Fusarium graminearum* Isolates from China by PCR Assay. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 7-8, p. 505–512, 2007.

JIN, F. *et al.* Fusarium-damaged kernels and deoxynivalenol in Fusarium-infected U.S. winter wheat. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 104, n. 5, p. 472–478, 2014.

KELLER, M. D.; BERGSTROM, G. C.; SHIELDS, E. J. The aerobiology of *Fusarium graminearum*. **Aerobiologia**, New York, v. 30, n. 2, p. 123–136, 2013.

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

- KIMURA, M. et al. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 539, p. 105–110, 2003.
- 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.
- LANDSCHOOT, S. et al. Connection between primary *Fusarium* inoculum on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheat ears in Flanders, Belgium. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 1297–1305, 2011.
- LEE, S. H. et al. Population structure of *Fusarium graminearum* from maize and rice in 2009 in Korea. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 26, n. 4, p. 321–327, 2010.
- LEE, T. et al. Identification of deoxynivalenol-and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 7, p. 2966, 2001.
- LEMMENS, M. et al. The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 299–308, 2004.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames, IA: Wiley Online Library, 2006. v. 2, 388 p.
- LOGRIECO, A. et al. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 597–609, 2002.
- MAIER, F. J. et al. Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. **Molecular plant pathology**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 449–461, 2006.
- MARÍN, S. et al. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 107–117, 1998.
- MARTINELLI, J. A. et al. Soybean pod blight and root rot caused by lineages of the *Fusarium graminearum* and the production of mycotoxins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 492-498, 2004.
- MCGEE, D. Epidemiological approach to disease management through seed technology. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 33, n. 1, p. 445–466, 1995.

MCMULLEN, M. *et al.* A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: Fusarium Head Blight. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 96, n. 12, p. 1712–1728, 2012.

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

MESTERHÁZY, Á. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to Fusarium head blight. **European Journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 675–684, 2002.

MESTERHÁZY, Á.; LEMMENS, M.; REID, L. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize - a review. **Plant Breeding**, Berlin, v. 131, n. 1, p. 1–19, 2012.

MIEDANER, T.; BOLDUAN, C.; MELCHINGER, A. E. Aggressiveness and mycotoxin production of eight isolates each of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* for ear rot on susceptible and resistant early maize inbred lines. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, n. 1, p. 113–123, 2010.

MIEDANER, T.; KORZUN, V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 102, n. 6, p. 560–566, 2012.

MILLER, J. D. *et al.* Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. **Mycologia**, New York, v. 83, n. 2, p. 121–130, 1991.

MONDS, R. *et al.* *Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and co-existence of species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 4, p. 410–420, 2005.

MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 705–713, 2003.

MUNKVOLD, G. P. Seed pathology progress in academia and industry. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 285–311, 2009.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Sant Paul, v. 81, n. 6, p. 556–565, 1997.

MUNKVOLD, G. P.; O'MARA, J. K. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatments for maize seedling blight caused by *Fusarium* species. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 86, n. 2, p. 143–150, 2002.

MURILLO-WILLIAMS, A.; MUNKVOLD, G. P. Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 92, n. 12, p. 1695–1700, 2008.

- NAYAKA, S. C. *et al.* Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 90, n. 5, p. 1625–1639, 2011.
- NDOYE, M. *et al.* Nivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* clade species are prevalent on maize throughout China. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 10, p. 519–524, 2012.
- NICHOLSON, P. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, n. 1, p. 17–37, 1998.
- NICHOLSON, P. *et al.* Molecular tools to study epidemiology and toxicology of *Fusarium* head blight of cereals. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 691–703, 2003.
- O'DONNELL, K. *et al.* Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 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 : FG & B**, San Diego, 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 : FG & B**, San Diego, v. 45, n. 11, p. 1514–1522, 2008.
- O'DONNELL, K. *et al.* Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3708–3718, 2010.
- 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**, Dordrecht, v. 127, n. 3, p. 407–417, 2010.
- PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Quantificação de propágulos de *Gibberella zeae* no ar e infecção de anteras em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 484–488, 2002.
- PAUL, P. A.; LIPPS, P. E.; MADDEN, L. V. Meta-analysis of regression coefficients for the relationship between fusarium head blight and deoxynivalenol content of wheat. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 96, n. 9, p. 951–961, 2006.
- PAUL, P. A. *et al.* Efficacy of triazole-based fungicides for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol control in wheat: a multivariate meta-analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, p. 999–1011, 2008.

PAULITZ, T. C. Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 80, p. 674–678, 1996.

PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium Head Blight Inoculum. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 92, n. 5, p. 800–807, 2008.

PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R.; SIMS, A. L. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 88, n. 7, p. 724–730, 2004.

PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 78, n. 1-2, p. 21–37, 1999.

PRUSSIN, A.; LI, Q.; MALLA, R. Monitoring the Long-Distance Transport of *Fusarium graminearum* from Field-Scale Sources of Inoculum. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 98, n. 4, p. 504–511, 2014.

PURAHONG, W. *et al.* Validation of a modified Petri-dish test to quantify aggressiveness of *Fusarium graminearum* in durum wheat. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 132, n. 3, p. 381–391, 2011.

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**, Sant 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, p. 15–24, 2008.

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

REID, L. *et al.* Effect of inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, or *Fusarium subglutinans* inoculated maize ears. **Canadian journal of plant pathology**, Ontario, v. 24, n. 2, p. 162–167, 2002.

REID, L.; HAMILTON, R.; MATHER, D. Effect of macroconidial suspension volume and concentration on expression of resistance to *Fusarium graminearum* in maize. **Plant disease**, Sant Paul, v. 79, n. 5, p. 461–466, 1995.

REID, L.; MATHER, D.; HAMILTON, R. Distribution of deoxynivalenol in *Fusarium graminearum*-infected maize ears. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 86, p. 110–114, 1996.

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

REPKA, V. *et al.* Responses of maize root cells to zearalenone and its derivatives α -zearalenol and β -zearalenol. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 138, n. 4, p. 787–797, 2013.

REYNOSO, M. M. *et al.* Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 2-3, p. 444–448, 2011.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. **Food additives and contaminants**, London, v. 22, n. 4, p. 369–378, 2005.

SAMPIETRO, D. A. *et al.* Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 359–364, 2011.

SARVER, B. A. J. *et al.* Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. **Fungal genetics and biology : FG & B**, San Diego, v. 48, n. 12, p. 1096–1107, 2011.

SCAUFLAIRE, J. *et al.* Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 1, p. 59–66, 2011.

SCHMALE, D. G. *et al.* Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 96, n. 9, p. 1021–1026, 2006.

SCHMALE, D. G. *et al.* Isolates of *Fusarium graminearum* collected 40–320 meters above ground level cause *Fusarium* head blight in wheat and produce trichothecene mycotoxins. **Aerobiologia**, New, York, v. 28, n. 1, p. 1–11, 2011a.

SCHMALE, 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, 2011b.

SCHMALE, D. G.; MUNKVOLD, G. P. **Mycotoxins in Crops: a threat to human and domestic animal health**. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Mycotoxins/Pages/default.aspx>. Acesso em: 15 jun. 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.

SELLA, L. *et al.* *Fusarium graminearum* possesses virulence factors common to Fusarium head blight of wheat and seedling rot of soybean, but differing in their impact on disease severity. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 104, n. 11, p. 1201-1207, 2014.

SHAH, D. A *et al.* Predicting Fusarium head blight epidemics with boosted regression trees. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 104, n. 7, p. 702–714, 2014.

SILVA, C. N. **Identificação molecular de espécies de Fusarium e genes preditivos de micotoxinas associados aos grãos de milho e trigo no centro-sul do Brasil.** 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

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**, Dordrecht, v. 133, n. 3, p. 621–629, 2012.

SPOLTI, P. *et al.* Single and sequential applications of metconazole alone or in mixture with pyraclostrobin to improve Fusarium head blight control and wheat yield in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 85-96, 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**, Sant Paul, v. 104, n. 5, p. 513–519, 2014a.

SPOLTI, P. *et al.* Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 98, n. 5, p. 607–613, 2014b.

STARKEY, D. E. *et al.* Global molecular surveillance reveals novel Fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity. **Fungal genetics and biology : FG & B**, San Diego, v. 44, n. 11, p. 1191–1204, 2007.

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

SUMMERELL, B. A.; BAHARUDDIN, S.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 87, n. February, p. 117–128, 2003.

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

TALAS, F. *et al.* Association of single nucleotide polymorphic sites in candidate genes with aggressiveness and deoxynivalenol production in *Fusarium graminearum* causing wheat head blight. **BMC genetics**, London, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2012.

TORRES, P. S.; QUAGLINO, M. B.; PILLAR, V. D. Properties of a randomization test for multifactor comparisons of groups. **Journal of Statistical Computation and Simulation**, New York, v. 80, n. 10, p. 1131–1150, 2010.

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.

VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 389, n. 1, p. 147–157, 2007.

VOSS, H. H. *et al.* Variation and transgression of aggressiveness among two *Gibberella zeae* crosses developed from highly aggressive parental isolates. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 100, n. 9, p. 904–12, 2010.

WALKER, S. L. *et al.* Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium Head Blight in North Carolina. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 85, n. 4, p. 404–410, 2001.

WANG, B. *et al.* Evolution of virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* using serial passage assays through susceptible cotton. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 98, n. 3, p. 296–303, mar. 2008.

WARD, T. J. *et al.* Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 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 : FG & B**, San Diego, v. 45, n. 4, p. 473–84, 2008.

WHITE, D. **Compendium of corn diseases**. Thi. St. Paul, Minnesota, USA: Ed. American Phytopathological Society. APS Press, 1999. p. 128.

WIESE, M. V. **Compendium of wheat diseases**. St. Paul Minnesota, USA. Ed. American Phytopathological Society. APS Press, 1977. p. 106.

WILKE, A. L. *et al.* Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 91, n. 9, p. 1109–1115, 2007.

WILLYERD, K. T. *et al.* Efficacy and stability of integrating fungicide and cultivar resistance to manage Fusarium Head Blight and deoxynivalenol in wheat. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 96, n. 7, p. 957–967, 2012.

WU, A. B. *et al.* Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from China revealed by wheat coleoptile and floret inoculations. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 160, n. 1, p. 75–83, 2005.

XU, X.; NICHOLSON, P. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 83–103, 2009.

YAN, W. *et al.* Effects of plant height on type I and type II resistance to fusarium head blight in wheat. **Plant Pathology**, [Oxford], v. 60, n. 3, p. 506–512, 2011.

YAZAR, S.; OMURTAG, G. Z. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 11, p. 2062–2090, 2008.

YLI-MATTILA, T. *et al.* A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 6, p. 841–852, 2009.

YOSHIDA, M.; NAKAJIMA, T. Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 100, n. 8, p. 763–773, 2010.

ZHANG, H. *et al.* Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in china show a shift to more aggressive isolates. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31722, 2012.

ZHANG, Z. *et al.* Geographic substructure of *Fusarium asiaticum* isolates collected from barley in China. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, n. 2, p. 239–248, 2010.