**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo de milho (*Zea mays* L.)

Pastora Josefina Querales

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

Pastora Josefina Querales
Engenheiro Agrônomo

Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo de milho (*Zea mays* L.)

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Querales, Pastora Josefina

Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à prodrisão do colmo do milho (*Zea mays* L.) / Pastora Josefina Querales. - - Piracicaba, 2010.
81 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Diversidade genética 2. Fungos fitopatogênicos 3. *Fusarium* 4. Milho 5. Podridão (Doença de planta) I. Título

CDD 633.15
Q4c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

A meu pai Felix, e meus sobrinhos José Rafael e Rafael Alfonso (*in memoriam*), apesar de não ter vivido com vocês os últimos momentos de suas vidas, meu consolo é: pai, a certeza de ter sido orgulho para você e exemplo para vocês meus queridos sobrinhos que continuam torcendo por meus sucessos no abrigo do nosso senhor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus meu eterno guia e protetor.

A minha instituição, Universidade Centroccidental “Lisandro Alvarado” por ter confiado em minha capacidade e pelo apoio financeiro.

A ESALQ-USP por abrir-me as portas e oferecer uma imensidão de conhecimento muito valioso para minha evolução profissional.

A meu orientador, professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pelo oportuno apoio, por disponibilizar parte de seu tempo para me orientar e pela oportunidade para aprimorar um conhecimento numa área quase nova para mim.

A os professores dos departamentos de Fitopatologia e Nematologia, Tecnologia de sementes e Ciências Exatas que me deram a valiosa oportunidade de aproveitar seus conhecimentos para enriquecer os meus.

Meu agradecimento muito especial à Dra. Maria Heloisa de Moraes, prof. Dr. Jose Octavio M. Menten, prof. Dr. Sergio Pascholati, prof. Dr. Julio Marco Filho e profa. Dr. Ana Novembro porque além de suas orientações acadêmicas me permitiram conhecer seu lado humano.

A meus pais Josefa, Felix (*in memoriam*) e Dília por seu amor e entender que as minhas decisões são necessidades de crescimento profissional.

A meu esposo e meu filho com seu amor, apoio e compreensão impediram a minha fraqueza e desistir de alcançar as metas propostas.

A minha família irmãos, sobrinhos, cunhadas, e amigos pelas palavras de estímulo durante estes quatro anos mostrando seu orgulho por meus triunfos e por esperar pacientemente a minha volta.

Às empresas Dow AgroSciences, GueraSementes, Aprossul e Pionner pelo fornecimento das sementes utilizadas nos ensaios.

A meus amigos da turma de estrangeiros; Hector, Landy, Freddy, Altagracia, Alba, Pepe, Alejandro, Pedro e Rosa todos juntos com suas famílias nos ajudaram a viver momentos inesquecíveis e cheios de recordações.

A meu amigo e irmão, Carlos com sua contagiante alegria fez de nossa passagem pelo Brasil um passeio de laser.

Ao anjo protetor da família encarnado em nossa amiga Fátima. Não existem palavras nem fatos com que possa dar de volta todo quanto ela fez por nós desde nossa chegada ao Brasil.

A todos os funcionários com quem compartilhei especialmente Fernanda, Rodolfo, e a Helena pelo apoio, orientações no trabalho do dia a dia e pela amizade.

Ao senhor Pedro Arthuso pelo apoio no trabalho de campo, respeito profissional e amizade.

Aos meus colegas dos laboratórios de Patologia de Sementes e Genética Molecular, Heloazinha, Annelise, Thais, Vanessa, Raphaelle, Bruno, Thayne, Carol Fazza, Lara, Fernanda, Fernandinha, Leandro, Giselle e Gerônimo, com eles compartilhei conhecimentos, experiências profissionais, momentos de alegrias e também de tristeza, mas, sempre com a feliz expressão brasileira que nunca esquecerei “no fim, todo vai dar certo”.

A meus amigos de coração; meus filhos Bruno e Thayne, Raphaelle, Greysi, Leandro, Tatiane, Mauro, Gerônimo, Fernando, Barbara, Julio e a Liliane. Abriram seu coração e permitiram-me sentir seu carinho. Obrigada pelo apoio e pelo carinho.

A meus amigos Diogo, Laura, Luana, Tathiana e Julia, foram embora, na procura de seu progresso profissional, mas ficarão por sempre em meu coração.

Às senhoras Carmen e Sirlene sempre alegres divertidas e dispostas a dar uma força para os alunos.

Aos alunos estagiários Annelise, Heloazinha, Lara e a Mariana porque suas funções nos laboratórios são indispensáveis para o desenvolvimento bem sucedido de nossas pesquisas. Obrigada pelo apoio.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Classificação taxonômica de <i>Fusarium</i>	21
2.2 Conceitos de espécie utilizados na classificação de <i>Fusarium</i>	21
2.3 Caracterização morfológica.....	22
2.3.1 Principais caracteres morfológicos.....	22
2.4 Caracterização molecular	24
2.5 O patossistema <i>Fusarium</i> -milho.....	25
2.6 Condições ambientais e aspectos nutricionais da planta que favorecem a patogenicidade de <i>Fusarium</i> spp.	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Amostras de sementes de milho	29
3.2 Incidência de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de milho	29
3.3 Obtenção de isolados de <i>Fusarium</i> spp.	29
3.3.1 Isolamento de <i>Fusarium</i> spp. de sementes	29
3.3.2 Obtenção de culturas monospóricas	30
3.4 Caracterização e identificação morfológica	30
3.4.2 Caracterização morfológica.....	31
3.4.3 Identificação morfológica.....	32
3.5 Caracterização molecular	32
3.5.1 Extração e quantificação de DNA de <i>Fusarium</i> spp.	32
3.5.2 Identificação da espécie utilizando reação da polimerase em cadeia (PCR).....	33
3.7 Estudo da diversidade genética dos isolados de <i>Fusarium</i> com marcadores AFLP	34
3.8 Patogenicidade e agressividade de isolados de <i>Fusarium</i> spp.	36
3.8.1 Determinação da agressividade dos isolados selecionados em três cultivares com diferentes níveis de resistência	37

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Incidência de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de milho	41
4.2	Isolamento de <i>Fusarium</i> spp. da semente	44
4.3	Caracterização cultural e morfológica dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	46
4.3.1	Caracterização cultural.....	46
4.3.2	Caracterização e identificação morfológica dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	47
4.4	Identificação molecular de <i>Fusarium</i> spp.....	58
4.5	Estudo da diversidade genética dos isolados de <i>Fusarium</i> com marcadores AFLP.....	60
4.6	Seleção de isolados patogênicos para testes de agressividade.....	65
4.7	Agressividade de isolados de <i>F. verticillioides</i> avaliada em colmos de milho.....	66
5	CONCLUSÕES	75
	REFERENCIAS	77

RESUMO

Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo de milho (*Zea mays* L.)

O gênero *Fusarium* é um grupo de fungos de importância mundial, não só por causar patologias em plantas, mas também porque abriga espécies toxigênicas. Dentre estas, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium subglutinans*, cujos teleomorfos se agrupam no complexo *Gibberella fujikuroi*, estão associadas a patologias em milho. O presente estudo caracterizou uma coleção de 100 isolados de *Fusarium* spp. tanto do ponto de vista morfológico como molecular com vistas a identificá-los em nível de espécie. Para isto, foram usados como marcadores morfológicos a presença/ausência de clamidósporos, o tipo de célula conidiogênica e a disposição dos microconídios sobre a célula conidiogênica. Os isolados foram também identificados em espécie baseado em informações disponíveis na literatura acerca de marcadores moleculares desenvolvidos a partir da reação de PCR e primers espécie-específicos. A ausência de clamidósporo permitiu alocar a totalidade dos isolados no complexo *G. fujikuroi*. Os demais critérios morfológicos permitiram identificar 77 isolados como *F. verticillioides*, 20 como *F. proliferatum*, 2 como *F. subglutinans*. Apenas 1 isolado não foi possível identificar em espécie. Análises moleculares concordaram em 100% dos casos em que os isolados foram identificados como *F. verticillioides* e *F. subglutinans*. Porém, no caso dos 20 isolados identificados morfolologicamente como *F. proliferatum* apenas 4 foram confirmados na análise molecular; os demais foram identificados como *F. verticillioides*. A diversidade genética estudada por AFLP ratificou a separação das espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, com um índice de similaridade de 0,40. Marcadores AFLP também evidenciaram alta diversidade genética de *F. verticillioides*. Todos os isolados causaram podridão do colmo em três híbridos comerciais de milho e não variaram em agressividade, independente do nível de resistência dos híbridos.

Palavras-chave: Diversidade genética; Complexo *G. fujikuroi*; *Zea mays* L.; Podridão do colmo

ABSTRACT

Morphological and genetic characterization of *Fusarium* spp. isolated from seed and associated to stalk rot corn (*Zea mays* L.)

The genus *Fusarium* is an important group of fungi worldwide, not only for its capability to cause disease but because it also contains species which produce toxins. Among these, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*, which teleomorphs are grouped in the *Gibberella fujikuroi* group are associated with diseases in maize. This study characterized a collection of 100 isolates of *Fusarium* spp. under morphological and molecular criteria to identify them at the species level. For this purpose, morphological markers such as presence/absence of chlamydospores, conidiogenous cell type and microconidia arrangement on conidiogenous cell were assessed. The isolates were also identified at the species level based upon available information about molecular markers developed from the PCR reaction using species-specific primers. The absence of chlamydospores in all of the isolates placed them within the *G. fujikuroi* complex, and based on the other morphological criteria, 77 isolates were identified as *F. verticillioides*, 20 as *F. proliferatum*, 2 as *F. subglutinans* and one isolate remained unidentified at the species level. The molecular analyses agreed with the morphological identification of all *F. verticillioides* and *F. subglutinans*. However, in the case of 20 isolates identified morphologically as *F. proliferatum* only 4 were confirmed, the rest being identified as *F. verticillioides*. The genetic diversity based on AFLP confirmed the separation of *F. verticillioides* and *F. proliferatum* in two groups, with a similarity index of 0.40. AFLP markers also showed high genetic diversity within *F. verticillioides*. All isolates were caused stalk rot on three commercial hybrids and did not vary in aggressiveness regardless of the resistance level of the hybrids.

Keywords: Genetic diversity; *G. fujikuroi* complex; *Zea mays* L.; Stalk rot

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Características das colônias de isolados de *Fusarium* spp. crescendo em meio de cultura BDA. **a1, a2, a3.** *F. verticillioides*; **b1, b2, b3.** *F. proliferatum*. **c1, c2.** *F. subglutinans*. **c3.** *Fusarium* sp..... 46
- Figura 2 - Estruturas morfológicas de isolados de *Fusarium* spp. (40x). **a.** microconídios em cadeia e falsa cabeça sobre monofiálide. **b.** Célula conidiogênica tipo polifiálide. **c.** célula conidiogênica semelhante à polifiálide. **d.** Esporodóquio laranja, escleródio sobre folha de craveiro. **e.** Macroconídio formado em esporodóquio. **f.** Asco com ascósporos. **g.** Engrossamento de hifas..... 48
- Figura 3 - Produtos da reação polimerase em cadeias (PCR) com primers específicos para *F. verticillioides* isolados de sementes de milho..... 58
- Figura 4 - Padrão de AFLP gerado a partir de 5 combinações de primers (E_AT+M_CA, E_AA+M_AG, E_AG+M_AA, E_AA+M_CC, E_CC+M_CC) na análise de 100 isolados de *Fusarium* spp. (complexo *G. fujikuroi*)..... 61
- Figura 5 - Dendrograma UPGMA para isolados de *Fusarium* spp.. do complexo *G. fujikuroi* (Correlação cofenética 0,97) pelo coeficiente de similaridade (Dice)..... 62
- Figura 6 - Gráfico da Análise de Coordenadas Principais para 100 isolados de *Fusarium* spp. (*G. fujikuroi*)..... 64
- Figura 7 - Efeito de interação isolado x ano no desenvolvimento da lesão necrótica no colmo do milho..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados sobre a procedência das amostras de sementes analisadas neste estudo.....	42
Tabela 2 -	Incidência de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de milho produzidas no Brasil submetidas ou não à assepsia superficial.....	43
Tabela 3 -	Identificação e origem de isolados monospóricos de <i>Fusarium</i> spp. oriundos de sementes de milho híbrido.....	44
Tabela 4 -	Marcadores morfológicos para a identificação de <i>Fusarium</i> spp. do complexo <i>G. fujikuroi</i>	50
Tabela 5 -	Comparação da identificação morfológica e molecular de isolados de <i>Fusarium</i> spp. associados às sementes de milhos produzidas no Brasil.....	56
Tabela 6 -	Dimensões dos microconídios e macroconídios de <i>Fusarium</i> spp.....	56
Tabela 7 -	Porcentagem de isolados com características morfológicas semelhantes.....	57
Tabela 8 -	Lista de combinações primers usados para determinar por AFLP a diversidade genética de <i>Fusarium</i> spp. (<i>G. fujikuroi</i>) presentes em sementes.....	61
Tabela 9 -	Comprimento da lesão necrótica causada por isolados de <i>F. verticillioides</i> inoculados em três híbridos comerciais com diferentes níveis de resistência.....	69
Tabela 10 -	Severidade da podridão do colmo do milho causada por isolados de <i>F. verticillioides</i> inoculados em três híbridos comerciais de milho com diferentes níveis de resistência.....	70
Tabela 11 -	Incidência do Tombamento de plantas devido ao dano causado por isolados de <i>F. verticillioides</i> inoculados no colmo de três híbridos de milho com diferentes níveis de resistência.....	72

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium*, segundo a classificação taxonômica, constitui um estado anamorfo da ordem Hypocreales do Filo Ascomycota (SEIFERT, 1996). Dentro deste grupo encontram-se as espécies *Fusarium verticillioides* ((Saccardo) Nirenberg), *Fusarium proliferatum* ((Matsushima) Nirenberg) e *Fusarium subglutinans* ((Wollenweber & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas), que representam os anamorfos das espécies *Gibberella moniliformis* (Wineland), *Gibberella intermedia* ((Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert) e *G. subglutinans* (Nelson, Toussoun & Marasas) respectivamente. Atualmente essas três espécies participam de um grupo de aproximadamente vinte espécies que compõem o complexo *Gibberella fujikuroi*, antigamente seção Liseola (LESLIE; SUMMERELL, 2006) e estão associadas a patologias de várias culturas de importância econômica, tais como milho, trigo e cana-de-açúcar, além de serem produtoras de micotoxinas.

A identificação de espécies de *Fusarium* é realizada, tradicionalmente, com base em aspectos morfológicos o que, além de constituir uma tarefa muito complexa pelo requerimento da experiência do avaliador, também pode gerar controvérsias devido à variabilidade dos caracteres fenotípicos analisados. É por isto que de forma reiterada se assinala que a classificação taxonômica atual do gênero requer uma revisão, já que características fenotípicas não são concordantes com os agrupamentos obtidos por caracterização molecular (KASSAWARA, 2005).

Em geral, a taxonomia de fungo está sofrendo mudanças devido à aceitação de diferentes critérios para definir o conceito de espécie. O que antigamente era mais subjetivo, baseado só em aspectos morfológicos, no novo paradigma abrange, além de critérios biológicos, critérios filogenéticos baseado em informações moleculares (SEIFERT, 2006; SUMMERELL et al., 2003).

Diversas técnicas moleculares têm sido usadas no auxílio da classificação de *Fusarium*. As relações filogenéticas, por exemplo, dentro do complexo de espécies *Gibberella fujikuroi* se ampliaram para novas estirpes descobertas através de informação obtida mediante sequenciamento de nucleotídeos de DNA amplificado pela reação da polimerase em cadeia (PCR) a partir de genes específicos, tais como β -tubulina, calmodulina e o fator de alongação (O'DONNELL et al., 2000).

Também na identificação de espécies patogênicas de *Fusarium*, a reação da polimerase em cadeia (PCR) tem sido um grande auxílio, por exemplo, na identificação de espécies do

complexo *Gibberella* em cereais de inverno (ANGELOTTI et al., 2006; SCHILLING et al., 1996) e na identificação de fungos toxigênicos associados a grãos (MULÉ et al., 2004).

Muitas espécies filogenéticas reconhecidas em *Fusarium* ocupam distintos nichos ecológicos, usualmente em plantas hospedeiras específicas (SEIFERT, 2006). Este gênero tem uma alta heterogeneidade de espécies quanto à caracterização morfológica, molecular, diversidade genética e no papel que cumprem na natureza, entre os quais se atribui a capacidade de promover o crescimento vegetal e interagir tanto com outras espécies patogênicas do mesmo gênero quanto com outras espécies de fungos (CARROL 1988; DIAZ et al., 2005). Isto representa uma dificuldade para assumir um critério só como regra de identificação.

A correta identificação de *Fusarium* spp. associadas às sementes de milho é indispensável para a condução de estratégias desde sua produção até o beneficiamento, levando em conta que as sementes constituem um dos principais veículos de disseminação de patógenos em campo. Também existem inúmeros relatos sobre a presença concomitante de espécies patogênicas e não patogênicas na semente. Estas últimas, consideradas endófitas que em alguns casos promovem benefícios para o desenvolvimento da planta, mas que também podem produzir toxinas nocivas ao homem e outros animais (DANIELSEN; JENSEN, 1998; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997a).

Do ponto de vista de sanidade de plantas, as espécies agrupadas no complexo *G. fujikuroi* são importantes por estarem associadas a várias doenças na cultura do milho (*Zea mays* L), sendo a podridão do colmo a de maior interesse em programas de melhoramento. Do gênero *Fusarium*, até agora foram relatadas *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* agrupadas nesse complexo, além de *F. graminearum* como agentes causais da podridão da espiga, do colmo e da raiz.

Na evolução econômica mundial, a produção do milho tem sido destaque com o Brasil ocupando o lugar de terceiro maior produtor, superado apenas por Estados Unidos seguido da China. No Brasil, este cereal é usado principalmente para alimentação animal. Nos Estados Unidos, cerca de 50% da produção é destinada a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e de ano para ano. Na Região Nordeste, o milho constitui alimento básico na alimentação humana, sendo fonte de energia para muitas pessoas que vivem no semi-árido. Pela sua versatilidade de uso, é um dos mais importantes produtos do setor agrícola no Brasil (CASTRO et al., 2009).

No intuito de gerar informação sobre a composição do complexo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw no Brasil; o presente trabalho objetivou aplicar técnicas morfológicas e moleculares para identificar e determinar a variabilidade genética de isolados presentes em sementes coletadas em diferentes regiões produtoras do Brasil. Também se objetivou avaliar alguns isolados como agentes de podridão do colmo frente a três híbridos comerciais com diferentes níveis de resistência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Classificação taxonômica de *Fusarium*

A taxonomia de fungos baseada em critérios morfológicos está sofrendo mudanças apoiadas em resultados da aplicação de técnicas moleculares a estes estudos. O gênero *Fusarium* é um exemplo que ilustra o crescente número de espécies ainda em descoberta ou sendo reconhecidas por taxonomistas de fungos. A maioria dos patologistas de plantas está familiarizado com as controvérsias taxonômicas neste gênero e com os diferentes conceitos subjetivos de espécie, que explicam em parte a disparidade em número de espécies admitida no período de 1935-1983. Três grupos dentro de gêneros são os exemplos mais específicos dessas mudanças, nomeados como o complexo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw (com o nome genérico referindo-se aos teleomorfo), o complexo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e o complexo *F. graminearum* (SEIFERT, 2006).

2.2 Conceitos de espécie utilizados na classificação de *Fusarium*

A identificação de *Fusarium* envolve três conceitos de espécie: o da espécie morfológica, baseada na similaridade dos caracteres morfológicos observáveis, denominados de marcadores morfológicos; o da espécie biológica, baseado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie; e o conceito de espécie filogenética, baseado na análise de seqüências gênicas (O'DONNELL et al., 2000; SUMMERELL et al., 2003). A adoção de novos modelos de classificação afeta a taxonomia do gênero já que por décadas foi baseada simplesmente em caracteres morfológicos. Por outro lado também cria controvérsias, pois muitos patologistas de plantas acreditam que tais modelos só acrescentam dificuldades para uma identificação prática na diagnose de agentes causais de doenças em plantas e que, portanto, tais modelos estão mais adaptados para os estudos realizados por micologistas. Não obstante, estas mudanças são pertinentes, dado que dentro deste gênero existem espécies muito próximas, fato que pode levar a uma diagnose errada com importantes consequências práticas.

A espécie *F. moniliforme* é um exemplo dos problemas mencionados acima. Antes de 1996, a espécie englobava espécimes referidos a vários anamorfos hoje conhecidos como *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides* e outras espécies recentemente descritas sob o conceito de espécies biológica e/ou filogenética. Neste ponto, o critério biológico foi de muita utilidade, pois foi confirmado que esse grupo de espécies pertence aos grupos de compatibilidade

A ao H do complexo *Gibberella fujikuroi*, também conhecido como secção Liseola (SEIFERT et al., 2003).

Estudos de cruzamentos férteis em condições de laboratório para reproduzir o teleomorfo, é uma técnica que garante uma correta identificação de uma espécie biológica do gênero *Fusarium*, mas requer tempo e condições climáticas bem controladas. O procedimento mais usado consiste em cruzar uma linhagem conhecida como macho com uma linhagem teste como fêmea (SUMMERELL et al., 2003). Este procedimento tem permitido avaliar em campo a possibilidade da ocorrência de cruzamentos entre isolados inoculados de forma natural. Segundo Huang et al. (1997), acredita-se que infecções múltiplas podem ter um importante impacto sobre a evolução dos fungos, devido a recombinações sexuais ou parassexuais.

2.3 Caracterização morfológica

Os atuais sistemas de classificação de *Fusarium* baseados em caracteres morfológicos são controversos devido à instabilidade morfológica do fungo. Segundo Whalley (2003), estudos moleculares mostraram que a separação de alguns gêneros baseada na morfologia de ascósporos, por exemplo, foi variável mesmo quando feitas em condições controladas. Também Kwas'na; Bateman (2005) apontam que a conidiogênese de *Fusarium* pode ser facilmente afetada por mudanças ambientais, principalmente pela composição do meio de cultura. Por fim, Dufault et al. (2006) encontraram que valores de temperatura e umidade diferentes do ótimo para o crescimento e taxa de produção de peritécios respectivamente, são limitantes para a caracterização morfológica destas espécies e mais ainda, podem resultar em uma variação biológica entre isolados.

Para maior complicação na identificação, existem espécies que, embora tenham fase teleomórfica desconhecida, partilham características suficientes para serem agrupadas dentro de complexos do gênero. Exemplo disso é *Fusarium chlamydosporu* que, conforme relatado por Morales et al. (2007) possui caracteres morfológicos próprios que permitem classificá-lo como uma espécie agrupada na seção Dlanimia, mas que, segundo análises das seqüências baseadas na região ITS agrupa-se no complexo *Gibberella*, fato inexplicável já que se desconhece a fase teleomórfica desta espécie.

2.3.1 Principais caracteres morfológicos

O conceito de espécie morfológica tem muita importância para uma classificação inicial de biodiversidade. Caracteres estruturais e fisiológicos têm sido usados como marcadores

morfológicos para diferenciar espécies do gênero *Fusarium*, mas o problema é que a quantidade de caracteres detectados é pouca se considerar o número de espécies a comparar (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Para *Fusarium*, os principais caracteres taxonômicos de classificação estão agrupados nas chaves sinótica de Nelson et al. (1983) para o agrupamento em nível de seções, e em Nirenberg; O'Donnell (1998), para classificação em nível de espécies dentro do complexo *Gibberella fujikuroi* (PFENNING; LIMA, 2008).

Segundo Nelson et al. (1983) as características usadas para a identificação de espécies de *Fusarium* avaliadas em condições controladas referem-se às estruturas reprodutivas tais como tipo de esporo assexuado e hifa reprodutiva, além da formação de clamidósporo num lapso de 10 – 14 dias de crescimento da cultura. Para Nirenberg; O'Donnell (1998) a identificação de espécies dentro do complexo *G. fujikuroi*, no caso específico das espécies associadas ao milho, as principais características são ausência de clamidósporo e a disposição dos microconídios sobre a célula conidiogênica que pode ser de tipo mono ou polifiálide.

De acordo com Agrios (2005), o clamidósporo é um esporo de origem assexuada de parede fina formada pela modificação de uma ou mais células de uma hifa do fungo. O gênero *Fusarium* é caracterizado pela formação deste esporo, porém, no caso de espécies do complexo *G. fujikuroi* uma das principais características é justamente sua ausência. Outras características do gênero *Fusarium*, tais como o tipo de esporodóquio e tipo de macroconídio são avaliadas quando se faz caracterização de um espécime, mas não têm um valor taxonômico para espécie dentro do complexo *G. fujikuroi*.

Em resumo, as características com valor taxonômico usadas para separar espécies dentro do complexo *G. fujikuroi* são o tipo de célula conidiogênica que suporta o microconídio e a disposição destes esporos sobre as mesmas (LESLIE; SUMMERELL, 2006), baseado na chave sinótica de Nirenberg; O'Donnell (1998) citadas anteriormente. Assim, *F. subglutinans* apresenta os microconídios dispostos sobre a célula conidiogênica exclusivamente em falsa cabeça, porém *F. verticillioides* e *F. proliferatum* apresentam-nas em cadeias e falsa cabeça. A diferença entre estas reside no tipo de célula conidiogênica, do tipo monofiálide em *F. verticillioides* e dos tipos mono e polifiálide em *F. proliferatum*.

2.4 Caracterização molecular

2.4.1 Técnicas moleculares úteis para o estudo genético de *Fusarium* spp.

A introdução da análise de DNA por PCR facilitou a caracterização, identificação e diagnose rápida dos patógenos, assim como estudos sobre sua epidemiologia (WEISING et al., 1995). No caso de *Fusarium*, a discriminação de espécies, formaes especiais e raças por métodos tradicionais são usualmente dificultosas pelos motivos expostos acima. Este fato foi relatado por Kassawara (2005), que demonstrou uma ampla variabilidade genética entre isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium* spp., a qual não esteve correlacionada com as características taxonômicas. Em muitas pesquisas com este gênero, seqüências gênicas são usadas para auxiliar a classificação de espécies. Alguns dos mais comumente utilizados são os genes que codificam para a beta-tubulina, calmodulina e o fator de alongação (MULÉ et al., 2004; O'DONNELL et al., 2000; SUMMERELL et al., 2003). Parece inevitável que a descrição de espécies baseada só no seqüenciamento será uma realidade, e será interessante ver se estes nomes serão designados como nomes temporários, análogos ao anamorfo ou se serão um fator determinante na eliminação da nomenclatura dual na sistemática micológica (SEIFERT, 2006).

Além de seqüências gênicas, outros marcadores moleculares também podem ser usados não só para auxiliar na classificação de *Fusarium*, mas, principalmente para avaliar o grau de diversidade entre e dentro de populações. Este é o caso dos marcadores AFLP (amplified fragment length polymorphism). O trabalho combinado de duas enzimas, uma de corte raro e outra de corte freqüente em uma etapa de digestão, permite obter diversidade de fragmentos do DNA que depois são amplificados seletivamente através de reações de PCR com primers específicos e finalmente separados em gel de alta resolução (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Na atualidade a técnica de AFLP é muito útil na avaliação de variações genéticas dentro de populações de espécies de *Fusarium*, principalmente para *F. verticillioides* e *F. graminearum* nas quais facilitou a geração dos mapas genéticos (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Apesar do alto custo, riscos de contaminação e a necessidade de experiência na condução desta técnica, seu uso permite uma diferenciação genética mais detalhada entre indivíduos.

A diversidade genética de *F. verticillioides* foi estudada combinando as técnicas AFLP e grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) por Reynoso et al. (2009) na Argentina, determinando que três populações em estudo foram genotipicamente diversas mas geneticamente similares, com potencial acasalamento ao acaso e intercâmbio de genes entre as três, devido à

reprodução sexuada do fungo ser comum e a dispersão de isolados eficiente na principal região produtora de milho nesse país. No Brasil, Lima et al., (2009) usou as mesmas técnicas para estudar a diversidade genética dos agentes causais da malformação em manga, determinado que *F. subglutinans* é genética e geograficamente diversa e provavelmente sua reprodução seja por clones de uma estirpe indígena.

Para o complexo *F. graminearum*, no qual diferenças morfológicas não são encontradas, a aplicação da técnica possibilita a análise de um número elevado de marcadores em um também elevado número de isolados por vez (SUGA et al., 2008). Em estudos do DNA de *F. proliferatum*, a técnica permitiu identificar e diferenciar genes que regulam a produção de micotoxinas daqueles que não, nas diferentes etapas de crescimento do fungo, além de gerar fragmentos adequados para marcadores de genes regulados pelo meio ambiente que participam de forma seletiva em eventos-chaves do ciclo de vida do fungo (JENEY et al., 2004).

2.5 O patossistema *Fusarium*-milho

Fusarium verticillioides e *F. proliferatum* são agentes causais de doenças em plântulas, raiz, colmo, espiga e em grãos de milho. Os principais danos ocorrem em espigas e colmos. As duas espécies apresentam muitas semelhanças morfológicas, conforme discutido acima, e podem ser isoladas de tecidos sintomáticos e assintomáticos, incluindo sementes (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997) o que dificulta determinar se a doença é causada por uma ou outra espécie.

F. verticillioides e *F. subglutinans* afetam as raízes, colo e primeiros internódios do colmo. A podridão do colmo geralmente inicia-se pouco depois da polinização e se torna mais severa à medida que a planta amadurece. A doença causada pelos dois patógenos apresenta os mesmos sintomas, que compreendem alteração na cor da medula passando por várias mudanças de descoloração esbranquiçada, rosa claro a salmão até tornar-se marrom. Em estádios mais avançados acontece perda da integridade do colmo formando-se cavidades no interior da medula, podendo ocorrer amadurecimento prematuro e quebra do colmo da planta (PEREIRA et al., 2005; SHURTLEFF, 1980). As perdas na produção estão intimamente ligadas com a interrupção precoce da translocação de fotoassimilados do colmo para o enchimento de grãos, devido à destruição dos tecidos internos do colmo e pela quebra e acamamento de plantas antes da colheita (NAZARENO, 1989).

2.6 Condições ambientais e aspectos nutricionais da planta que favorecem a patogenicidade de *Fusarium* spp.

O comportamento de plantas atacadas e perdas relativas à podridão do colmo do milho vão depender das condições ambientais, a exemplo das demais doenças vegetais. Além disso, a variabilidade dos patógenos com relação à virulência, a heterogeneidade de distribuição dos patógenos no solo, a uniformidade genética das cultivares e a disponibilidade de nutrientes nos campos, entre outros, também são fatores condicionantes (NAZARENO, 1989).

Segundo Denti e Reis (2003), a dominância das espécies de fungos causadores da podridão do colmo é diferente entre safras: a ocorrência de *C. graminicola* pode ser maior em safras com maior precipitação, a de *Diplodia maydis* em períodos com estiagem mais prolongada e de *D. macrospora* quando as condições de umidade são inferiores a 50. No caso de *Fusarium*, acredita-se que sua incidência seja desfavorecida em safra de excessiva precipitação, já que isto pode diminuir sua dispersão pelo ar. Em adição a isto, os autores verificaram que na safra de menor precipitação a incidência de ferimentos causados por insetos pode ser maior, o qual favorece a penetração de todos estes patógenos. Estudos combinando diferentes épocas de inoculação e diferentes épocas de avaliação são necessários para esclarecer o comportamento de *F. moniliforme* na colonização do colmo e o efeito na produção de grão, pois acima dos 30 dias após emergência (DAE) não determinaram influências significativas na severidade da podridão do colmo no final do ciclo da cultura (BORGES et al., 2001).

A fertilidade também é um fator envolvido na predisposição a podridão do colmo, pois menores incidências desta doença foram observadas em tratamentos onde a quantidade de nitrogênio e potássio aplicada foi maior (DENTI; REIS, 2003). O equilíbrio entre estes dois nutrientes determina a quantidade de aminoácidos e açúcares solúveis acumuladas no colmo de milho, os quais são nutrientes e fonte de energia para os fungos. Por outro lado, uma deficiência pode causar o atraso no processo de cicatrização das lesões da planta, favorecendo a entrada dos fungos (YAMADA, 1995).

A influência da temperatura tem sido estudada para *F. moniliforme* e *F. proliferatum*, determinando-se que apesar de *F. moniliforme* (*F. verticillioides*) estar adaptado a uma ampla faixa de temperatura, estas espécies estão relacionadas e chegam a ser confundidas porque as duas são encontradas em culturas de milho de clima temperado e produzem fumonisinas. Além disso, podem ser isoladas de tecidos sintomáticos e assintomáticos, incluindo sementes, e têm um ciclo

da doença muito semelhante (MUNKVOLD et al., 1997b). Mas, segundo Wilke et al. (2007), *F. verticillioides* causa infecções sistêmicas assintomáticas em plantas de milho numa ampla faixa de temperatura. *Fusarium subglutinans* como agente causal da podridão do colmo, tem sido associado a esta doença em regiões úmidas e frias em países do norte da America (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Castellá et al. (1999) encontraram que a taxa de crescimento deste fungo foi mais alta numa faixa de 20 -25 °C tendo o milho como substrato, entanto, crescendo sobre arroz foi maior a taxa de crescimento a temperatura de 15°C, mas, produziu maior quantidade de fusaproliferin em milho a 20°C. As condições de temperatura para *F. subglutinans* incitar a fusariose em folhas de abacaxizeiro tem sido determinadas numa faixa de temperatura de 10 a 30°C e mais favoráveis entre 15 e 25 °C, variando apenas o grau de evolução do tamanho das lesões (MARTELLETO et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de sementes de milho

Dezoito amostras (1 kg por amostra) de sementes de milho híbrido foram coletadas nas principais regiões produtoras do Brasil e processadas para o isolamento de *Fusarium* spp. As amostras foram provenientes de campos de produção das empresas Dow AgroSciences (SP, MG e BA), GuerraSementes (PA); Aprossul e Pioneer (RS) e Aprossul (MS) das safras dos anos 2001 a 2006. As sementes foram preservadas em ambiente controlado de 20°C e umidade relativa entre 45 e 50% durante o período de processamento.

3.2 Incidência de *Fusarium* spp. em sementes de milho

A avaliação da incidência de *Fusarium* spp. nas sementes foi realizada em uma amostra de 200 sementes que recebeu tratamento de assepsia superficial. A assepsia superficial consistiu na imersão das sementes em uma solução de hipoclorito de sódio a uma concentração de 1% durante 3 minutos.

A incidência do fungo foi avaliada utilizando-se o método de papel de filtro modificado (CASA et al., 2005; MARTHUR; KONGSDAL, 2003; NEERGAARD, 1979). Para isto, foram colocadas 3 folhas de papel filtro úmidas em placas de petri de plástico de 9 cm de diâmetro sobre as quais foram distribuídas 10 sementes num total de 5 placas por repetição e 4 repetições por amostra.

As sementes foram incubadas a temperatura de 20±2°C sob luz branca e regime de fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Em seguida, foram acondicionadas a -20°C por 24 horas. Posteriormente, as sementes foram incubadas nas condições de temperatura e luz anteriormente relatadas durante 6 dias (MARTHUR; KONGSDAL, 2003).

Após o período de incubação, a incidência de *Fusarium* spp. nas sementes foi determinada através da visualização em estereomicroscópio, observando-se a presença ou ausência de estruturas reprodutivas características do gênero. Quando necessário foram preparadas lâminas para observação das estruturas do fungo em microscópio óptico.

3.3 Obtenção de isolados de *Fusarium* spp.

3.3.1 Isolamento de *Fusarium* spp. de sementes

Para o isolamento estruturas reprodutivas e micélio característicos do gênero foram transferidas para placas de petri contendo meio de cultura ágar-água (AA) em condições

assépticas com o auxílio de agulha histológica e esteremicroscópio. As placas foram incubadas em câmara climática com temperatura controlada a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz próxima a ultravioleta (NUV) com fotoperíodo de 12 horas luz / 12 horas escuro durante 7 dias. Após a incubação e sob visualização em microscópio estereoscópico, os isolados que apresentaram estruturas características de *Fusarium* spp. foram transferidos para placas contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) para obtenção de cultura pura. As condições de temperatura, fotoperíodo e período de incubação neste caso foram as mesmas descritas anteriormente.

3.3.2 Obtenção de culturas monospóricas

Com o auxílio de uma agulha histológica, microconídios foram transferidos para tubos de ensaio contendo 1 ml de água destilada estéril e submetidos a agitação. Esta suspensão foi diluída em um novo tubo com a mesma quantidade de água destilada estéril. Após agitação, 20 μL da suspensão foram plaqueados com auxílio de alça de drigalski em placas de petri contendo meio ágar-água (AA). As placas foram incubadas em câmara climática com temperatura controlada a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz branca com fotoperíodo de 12 horas luz / 12 escuro durante 24 horas.

Após a incubação, sob microscópio estereoscópico e em condição asséptica foi selecionado de cada isolado um microconídio com desenvolvimento do tubo germinativo de comprimento maior que o comprimento do conídio, transferido para placa contendo meio BDA e incubado em câmara climática sob condições controladas de temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz NUV com fotoperíodo de 12 horas luz/12 escuro durante 10 dias. Após o desenvolvimento das colônias, 15 discos de meio de cultura de 5 mm de diâmetro contendo as estruturas fúngicas de cada isolado foram preservados pelo método de Castellani (BARRETO, 1967).

3.4 Caracterização e identificação morfológica

3.4.1 Caracterização cultural

O índice de crescimento da colônia foi avaliado como base em mensurações dos diâmetros perpendiculares da colônia com auxílio de uma régua milimetrada durante 8 dias em intervalos de dois dias (FRENCH; HERBERT, 1980). Finalizada a avaliação do índice de crescimento, as culturas foram mantidas nas mesmas condições para avaliar o aspecto e a cor da colônia aos 10 dias de incubação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições. As avaliações foram feitas em intervalos de 2 dias durante um período máximo de 8 dias, totalizando 4 avaliações. O ensaio foi mantido sob condições experimentais controladas de

temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz NUV com fotoperíodo de 12 horas luz/12 escuro. Os dados foram analisados utilizando metodologia descrita por Oliveira “apud” Machado et al. (2001) e com o auxílio do programa estatístico Statistix 8.0.

3.4.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos isolados foi feita baseada nos caracteres morfológicos estudados para a maioria das espécies do gênero *Fusarium* associadas ao milho (NELSON et al., 1983, NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; LESLIE; SUMMERELL, 2006), tais como ausência de clamidósporo, tipo de célula conidiogênica (monofiálide ou polifiálide), tipo de células reprodutivas (macroconídio e microconídio), dimensões das estruturas reprodutivas, disposição dos microconídios sobre a célula conidiogênica (em cadeia ou em “falsa cabeça”) e estrutura de formação dos macroconídios (esporodóquio ou micélio aéreo).

Em culturas monospóricas crescendo sobre meio ágar folha de craveiro (CLA) foram avaliadas a formação de esporodóquio e características do macroconídio (medidas de comprimento por largura, número de septos e forma das células pé e apical); e em meio SNA (synthetic nutrient-poor ágar) foi avaliado o tipo de célula conidiogênica, disposição dos microconídios, comprimento por largura dos microconídios e confirmou-se a presença/ausência de clamidósporo, seguindo estudos feitos por Booth (1971), Leslie; Summerell, (2006); Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991), Summerell et al. (2003). Todas as culturas foram incubadas sob condições controladas de temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz NUV com fotoperíodo de 12 horas luz/12 escuro durante 10 a 20 dias com algumas exceções.

A avaliação das características dos microconídios foi realizada em microculturas, que consistiu em acondicionar cubos de 1x1cm aproximadamente de meio SNA colonizados pelo fungo sobre lâminas de vidro. Para isto, micélio de cultura monospórica de cada isolado crescendo em BDA foi retirado com auxílio de uma agulha histológica e colocado pelas bordas do ágar e cobertos com uma lamínula (GONÇALVES; COUTO, 2007). As lâminas de microculturas foram incubada em câmara úmida sob luz branca com fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas em escuro durante 3 dias. Após o período de incubação foi realizada a mensuração do comprimento e largura dos microconídios.

Baseado na metodologia aplicada por Caldari (1998); Tozze (2007), as dimensões dos esporos de cada isolado foram avaliadas em 30 microconídios selecionados ao acaso em cinco campos diferentes sob aumento de 400X, sendo necessária precaução para não desmanchar a

disposição dos conídios sobre a fiálide. Com auxílio de um sistema de vídeo-câmara acoplado ao microscópio, a mensuração foi realizada de forma indireta na imagem projetada na tela do monitor televisivo (Color Vídeo Monitor Panasonic CT - 2084 Y). Para isto, foi utilizado um sistema digital de câmara de vídeo (Digital Color Câmera CCD 1/3" SDC – 320 Samsung) acoplado ao microscópio óptico. Os valores correspondentes às imagens projetadas (cm) foram convertidos para a escala real dos conídios (μm). Para a conversão foi utilizada uma lâmina micrografada (Carl Zeiss) e sua imagem no aumento 400X foi projetada no monitor e mensurada com uma régua milimetrada, sendo que cada 50 μm na lâmina correspondiam a 15,7 cm na imagem no monitor.

Para avaliar as características dos macroconídios, estes foram coletados de esporodóquios formados sobre folhas de craveiro em meio de cultura CLA e corados com lacto-glicerol. As medidas dos esporos foram feitas seguindo a metodologia anteriormente descrita para avaliar os microconídios. Para isto, foram preparadas lâminas de vidro contendo lacto-glicerol incolor e com auxílio de agulha histológica adicionou-se esporodóquios formados sobre folhas de craveiro em meio de cultura CLA.

3.4.3 Identificação morfológica

Para a identificação dos isolados segundo o critério morfológico foram considerados os marcadores morfológicos de cada uma das espécies de interesse descritos por Nelson et al. (1983); Leslie e Summerell, (2006). Para identificar cada espécie como membro do grupo chamado complexo *G. fujikuroi* (seção Liseola) foi avaliado presença ou ausência de clamidósporos, e para identificar cada espécie; foi considerada a presença de microconídios em cadeia sobre monofiálide para *Fusarium verticillioides*, presença de microconídio em cadeias sobre polifiálide para *F. proliferatum* e para *F. subglutinans* a presença de microconídio dispostos exclusivamente em falsa cabeça sobre monofiálide e/ou polifiálide.

3.5 Caracterização molecular

3.5.1 Extração e quantificação de DNA de *Fusarium* spp.

A extração de DNA foi realizada a partir de micélio e estruturas reprodutivas formadas em monoculturas dos isolados cultivados em meio BDA durante 7 a 10 dias, em câmara climática de $20\pm 2^\circ\text{C}$ e sob luz NUV com fotoperíodos de 12 horas. Com auxílio de agulha histológica o micélio foi transferido a um tubo de 1,5 ml contendo 500 μL de tampão de extração (0,7M NaCl,

10%CTAB, 50mM Tris pH 8,0, 10mM EDTA) adicionado com 1,5 µL de beta-mercaptoetanol. Estes tubos foram homogeneizados utilizando-se o vortex por 1 minuto e incubados 60 °C durante 1 hora sendo agitados manualmente em intervalos de 15 minutos.

Utilizando-se a capela de exaustão, após o período de incubação foram adicionados 600 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, e a emulsão resultante foi agitada vagarosamente por 2 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm a 25 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido em volume de 400 µL para novos tubos de 1,5 ml e adicionado 600 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. A solução foi homogeneizada manualmente por inversão durante 2 minutos e os tubos foram centrifugados sob as mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi transferido para tubo de 1,5 ml e contendo 400 µL de 2-propanol a 15 °C. Os tubos foram invertidos delicadamente por 4-6 vezes e incubados a -20 °C durante 12 horas.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.000 RPM a 25 °C durante 8 minutos, e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foram adicionados 300 µL de etanol 70% a 15°C seguido de centrifugação a 13.000 RPM e 25 °C durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido utilizando-se etanol 100%. Após as lavagens utilizando-se etanol e descarte do sobrenadante, os peletes de DNA foram secos em estufa a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida, o DNA foi ressuspensionado em 30µl de solução TE (10mMTris e 1mM EDTA) e foram adicionados 12,5µL de solução de Rnase (Invitrogen) na concentração de 10µg/ml. A digestão de RNA ocorreu a 37°C por 30 minutos. As concentrações de DNA (ng/ µL) foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop (Uniscience).

3.5.2 Identificação da espécie utilizando reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para a identificação molecular foram utilizados iniciadores específicos desenvolvidos para as espécies *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* baseados na sequência parcial do gene que codifica para calmodulina segundo o protocolo proposto por Mulé et al., (2004). Os iniciadores utilizados foram VER1 5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3' e VER2 5'-AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3' (*F. verticillioides*); - PRO1 5'-CTTTCCGCCAAGTTTCTTC-3' e PRO2- 5'-TG TCAGTAACTCGACGTTGTTG-3' (*F. proliferatum*) e SUB1 5'-CTGTCGCTAACCTCTTTATCCA-3' e SUB2 5'-CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA-3' (*F. subglutinans*). As reações foram realizadas em

volume final de 15µL, contendo 1X tampão de PCR (Fermentas), 2,0 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,2 mM dNTPs (Fermentas), 0,3 µM de cada iniciador, 1,25 unidade de *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) e aproximadamente 60 ng de DNA. As reações de PCR foram realizadas em termociclador MJ Research, Inc.

O programa utilizado foi de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 50 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e extensão final de 72°C por 7 minutos. Cada uma das espécies estudadas foi identificada devido a amplificação do tamanho do fragmento amplificado esperado, sendo que para *F. verticillioides* foi de 578 pb, para *F. proliferatum* de 585 pb e no caso de *F. subglutinans* de 631pb, descritos por Mulé et al. (2004).

3.6 Estudo da diversidade genética dos isolados de *Fusarium* com marcadores AFLP

A obtenção de marcadores AFLP foi feita baseado no protocolo adaptado de Vos et al. (1995). A reação de digestão do DNA genômico foi realizada com duas enzimas; uma de corte raro (*Eco*RI, New England-Biolabs) e a outra de corte freqüente (*Mse*I, New England-Biolabs) em reação composta de 1X de tampão OnePhorAll (OPA), 1X de Albumina bovina (BSA -10 µg/µL), 120 ng de DNA e 2,0 unidade de cada uma das enzimas completando com água milli-Q estéril em volume final de 20 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas. A inativação das enzimas de restrição foi ocasionada pela incubação a 70 °C durante 15 min.

Após a digestão, procedeu-se a ligação de adaptadores em reação composta de 1X de tampão da ligase, 0,5µM de cada um dos adaptadores e 0,4 unidades de T4 DNA ligase (3unidades/µl – Fermentas) em volume final de 4µl acrescentado a cada tubo com DNA previamente digerido. A incubação foi realizada a 23°C por três horas.

A amplificação de fragmentos de DNA foi realizada em duas etapas, denominadas pré-amplificação e amplificação seletiva. Para a reação de pré-amplificação foram utilizados 0,25 µM de cada um dos iniciadores *Eco*RI adicionados de um nucleotídeo (E+A e E+C) combinados com os 0,25 µM iniciadores *Mse*I adicionados de um nucleotídeo (M+A e M+C), 0,2 mM de dNTPs, 1,0 X de tampão, 1,5mM de MgCl₂, 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e 1,0 µL de DNA digerido e ligado completando um volume final de 10 µL com água Milli-Q estéril. As reações de pré-amplificação foram realizadas utilizando o programa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 26 ciclos compostos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e no final um ciclo de extensão por 5 minutos a 72°C em termociclador MJ Research Inc. Após a amplificação foram acrescentados 40 µL de água estéril em cada reação.

A amplificação seletiva usou iniciadores de dois nucleotídeos, sendo um adicional ao usado na pré-amplificação. As combinações usadas foram EAA e MCC, EAA e MAG, EAT e MCA, EAG e MAA, ECC e MCC. A reação foi composta de 0,25 μ M do iniciador *EcoRI*, 0,30 μ M do iniciador *MseI*, 0,2 mM de dNTPs, 1,2mM de $MgCl_2$, 1,0 unidades de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L) e 2,0 μ L de DNA pré-amplificado diluído com água Milli-Q estéril em volume final de 20 μ L. Para a amplificação de fragmentos foi utilizado um programa de desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos, seguido de 36 ciclos compostos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de extensão de 72 °C por 1 minuto.

Os marcadores foram resolvidos em géis de acrilamida. Para tanto, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% de 0.5 mm de espessura com utilização do sistema “Sequi-gen GT” (BioRad) de 38 X 50 cm. Para preparo da solução matriz foram utilizados 420 g de uréia, 3g de bisacrilamida e 60g de acrilamida, diluídos em TBE 1X em volume de 1 litro.

Para o preparo do gel foram utilizados 160 ml da solução matriz, 160 μ L de TEMED (Promega) e 1100 μ L de persulfato de amônio 10% (Promega). Após a polimerização, foi realizada uma “pré-corrida”, à potência constante de 80 W por 1 hora, em cuba contendo TBE 1X na parte superior e solução de acetato de sódio 0,5M preparada em TBE 1X na parte inferior. A temperatura máxima foi de 50°C. O tempo de eletroforese foi de 4 horas. Previamente à aplicação das amostras resultantes da amplificação seletiva, as mesmas foram adicionadas de 7 μ L de formamida e incubadas no termociclador por 5 minutos a 95 °C para desnaturação e incubadas imediatamente em gelo até o momento da aplicação.

A revelação dos géis foi feita segundo protocolo adaptado de Creste et. al., (2001). Os géis foram fixados em 2 litros de solução 1% ácido acético glacial e 10% de álcool etílico por 10 minutos sob agitação constante. Após este período, procedeu-se lavagem por 1 minuto em 2 litros de água destilada sob agitação. Em seguida, foi efetuada uma etapa de pré-tratamento por 2’40’’ em ácido nítrico 1,5% e outra lavagem com dois litros de água destilada. Posteriormente, os géis foram tratados com solução de nitrato de prata 0,2%, sob agitação, por 20 minutos, e duas lavagens em 2 litros de água de 30 segundos cada. A revelação foi feita em duplo tratamento utilizando dois litros de solução gelada contendo 30g/l de carbonato de sódio adicionado de 600 μ L de formaldeído 37%. Esta fase foi feita em duas etapas, na primeira etapa foi utilizado 1 litro de

solução para revelação do gel até a visualização dos fragmentos, em seguida, a solução foi descartada. Na segunda etapa o restante da solução foi utilizado para revelação até a boa visualização dos fragmentos.

Depois de revelados, os géis foram submetidos a um tratamento de bloqueio (ácido acético 5%) durante 5 minutos, finalizando com uma lavagem por 1 minuto com 2L de água destilada. Terminado o processo os géis foram acondicionados na posição vertical para secar a temperatura ambiente. A avaliação foi feita visualmente num trans-iluminador de luz branca.

Os fragmentos visualizados produziram uma tabela binária conforme a presença (1) ou ausência (0) de fragmento para um determinado isolado. Foram considerados a totalidade de fragmentos reproduzidos na faixa entre 500 e 100 pb de cada gel. Foi gerado um gel controle para o qual foi selecionado ao acaso um conjunto de isolados e processados novamente sob iguais condições junto a isolados de fungos não pertencentes ao gênero *Fusarium* a partir de uma nova extração de DNA, reação de digestão, pré-amplificação e amplificação seletiva. Os dados foram analisados utilizando-se o programa NTSYSpc (ROHLF, 2000). A matriz de similaridade foi calculada com base no coeficiente de Dice ($D(ij) = 2a / (2a + b + c)$), onde $D(ij)$ é a medida de similaridade entre isolados “i” e “j”, “a” o numero de bandas compartilhadas por “i” e “j”, “b” é o numero de bandas presentes em “i” e ausentes em “j”, e “c” o numero de bandas presentes em “j” e ausentes em “i”. Os dados obtidos foram utilizados na análise de agrupamento pelo método UPGMA (ROHLF, 2000) para a construção do dendrograma e do gráfico de coordenadas principais.

3.7 Patogenicidade e agressividade de isolados de *Fusarium* spp.

Os ensaios para determinar a patogenicidade e agressividade de isolados de *Fusarium* spp. foram conduzidos no campus de Fitopatologia da ESALQ-USP, durante os períodos de maio – agosto/2007, outubro/2007–fevereiro/2008 e outubro/ 2008 a fevereiro/ 2009.

A patogenicidade dos cem isolados como agentes da podridão do colmo foi testada em um híbrido de milho suscetível (AG8060) com o fim de selecionar isolados patogênicos de *Fusarium* spp. associados às sementes e com estes avaliar posteriormente sua agressividade para causar a doença.

A seleção dos isolados foi realizada de acordo com a expressão dos sintomas típicos da podridão do colmo relatados por Shurtleff (1980). Para isto, foi instalado um ensaio de campo, em uma parcela de 10x12 m² usando como planta testadora o milho híbrido comercial AG-8060

caracterizado como suscetível a *Fusarium* spp. As plantas foram inoculadas após atingirem o estágio fenológico V (após florescimento e início da polinização) (FANCELLI; DOURADO, 2004) com 100 isolados de *Fusarium* spp. obtidos de sementes.

A inoculação consistiu em colocar no primeiro internódio do colmo do milho, 1 ml de suspensão de esporos de concentração de 1×10^6 conídios/ml usando uma seringa descartável, ajustando a concentração com o uso do hematocítmetro (FRENCH; HERBERT, 1980). Antes da inoculação foi feito um ferimento com uma furadora manual atingindo a medula do colmo, para facilitar a entrada do inóculo. O preparo do inóculo consistiu na lavagem com 10 ml de água destilada estéril de 2 placas contendo culturas dos isolados de 7 -10 dias crescendo em meio de cultura batata dextrose agar (BDA). A suspensão foi transferida para um erlenmeyer contendo 40 ml de água destilada estéril filtrando através gaze estéril para garantir na composição do inóculo só de conídios.

A variável avaliada foi comprimento da lesão necrótica causada pelos fungos aos 30 dias após a inoculação e consistiu em cortar os colmos de milho até o ponto de inserção da espiga em sentido longitudinal com ajuda de uma serra elétrica e mensurar com uma fita graduada o comprimento da lesão necrótica.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições cada uma representada por uma planta. O experimento compreendeu usado um total de 10 fileiras com 60 plantas cada uma, deixando 2 linhas de bordadura. Os tratamentos consistiram nos 100 isolados e uma testemunha na qual foi aplicada uma injeção de 1 ml de água destilada estéril no internódio inferior da planta. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico Statistix 8.0 para determinar a significância quanto as diferenças em agressividade inferida através da severidade dos sintomas.

3.7.1 Determinação da agressividade dos isolados selecionados em três cultivares com diferentes níveis de resistência

O ensaio foi instalado no mesmo local do ensaio anterior durante o período de novembro-2007/Março-2008 e outubro- 2008 / fevereiro-2009. O delineamento experimental foi em parcelas subdividas com 4 repetições e 10 plantas por repetição para cada tratamento. Em total foram 7 tratamentos que consistiram em 6 isolados selecionados no ensaio anterior e uma testemunha.

Foram utilizados 3 híbridos, identificados com os códigos 2B710, 2A525 e AG8060 catalogados como resistente, parcialmente resistente e suscetível a podridão do colmo

respectivamente. Os três são caracterizados como de tipo simples, de ciclo precoce, adaptados as condições de plantio de safra, para serem semeados em uma densidade de semeadura de 55 a 60 mil, 60 a 70 mil e 65 a 75 mil plantas por ha respectivamente. Todos os híbridos usados nesta pesquisa são resistentes ao acamamento e se adaptam a todas as regiões climáticas onde se cultiva milho no Brasil, a exceção do híbrido AG8060 que não se adapta às condições do estado de Rio Grande do Sul. Diferem no porte de planta e altura da espiga, sendo o de maior altura o 2A525 com 2.30m de altura de planta e 1.30m a altura da espiga, seguido de AG-8060 com uma altura de planta de 2,15m e da espiga de 1,15m e o híbrido 2B710 de menor porte com 2.02m de altura de planta e 1.10m de altura da espiga (CRUZ; PEREIRA FILHO, 2006).

A semeadura foi realizada utilizando um espaçamento de 0,80 x 0,20 m, para um total de 31 fileiras com 24 úteis, sendo 2 por cultivar e 6 por bloco com uma de bordadura entre blocos e 2 de bordadura da parcela.

O preparo do inoculo e a inoculação das plantas foi feita seguindo a mesma metodologia explicitada para o ensaio anterior. A avaliação foi realizada aos 120 dias após a emergência de plântulas (DAE). As variáveis avaliadas foram incidência do acamamento de plantas que consistiu em aplicar força mecânica na base do colmo das plantas inoculadas. Seguidamente foi medida a extensão da lesão necrótica estimada através do corte dos colmos em sentido longitudinal desde a zona de inserção das raízes até o ponto de inserção da espiga com ajuda de uma serra elétrica e mensuração do comprimento da lesão com uma fita graduada (Matiello, 2004).

Para determinar severidade da podridão do colmo, o comprimento da lesão foi considerado a proporção de tecido do colmo afetado pelo fungo relativo à altura de inserção da espiga, assumindo esta como a altura máxima que o fungo percorre em seu desenvolvimento sistêmico.

Foram feitas análises de variância individuais e combinadas por ano, considerando cada ano de avaliação como ambientes distintos. No combinado por ano se utilizou o seguinte modelo linear aditivo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \gamma_l + \beta_{j(l)} + (\alpha\gamma)_{il} + (\alpha\beta\gamma)_{ijl} + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + (\tau\gamma)_{kl} + (\alpha\tau\gamma)_{ikl} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde Y_{ijkl} = refere-se ao valor observado no híbrido i , inoculado com a estirpe k , na repetição j , dentro do ambiente l ; μ é a média geral do caráter; α_i é o efeito fixo do híbrido i ; γ_l é

o efeito aleatório do l th ambiente de avaliação; $\beta_{j(l)}$ é o efeito aleatório da j th repetição dentro do l th ambiente; $(\alpha\gamma)_{il}$ é o efeito de interação entre o i th híbrido com o l th ambiente; $(\alpha\beta\gamma)_{ijl}$ refere-se ao efeito do erro associado à parcela principal (erro “a”); τ_k é o efeito fixo do k th isolados; $(\alpha\tau)_{ik}$ é o efeito da interação entre o i th híbrido com o k th isolado; $(\tau\gamma)_{kl}$ é o efeito da interação entre o k th isolado com l th ambiente; $\alpha\tau\gamma_{ikl}$ é o efeito de interação de segundo ordem entre o i th híbrido com o k th isolado no l th ambiente, e ε_{ijkl} é o erro associado à subparcela (erro “b”).

Na derivação das esperanças dos quadrados médios e para a realização dos testes F , os híbridos e os isolados foram considerados efeitos fixos, enquanto que os ambientes e repetições foram considerados efeitos aleatórios. Em todas as análises foi utilizado o programa estadístico SAS (versão 9.1- SAS INSTITUTE, 2003). Foi necessário transformar os dados de comprimento da lesão necrótica e de severidade da podridão do colmo para a safra 2008 - 2009, de acordo a $Y = \sqrt{x+1/2}$. A análise da variância e o teste de contraste múltiplo (Tukey) permitiram inferências sobre a agressividade dos isolados, e o consequente comportamento dos híbridos frente a cada isolado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Incidência de *Fusarium* spp. em sementes de milho

Dezoito amostras de sementes provenientes de diferentes estados do país (Tabela 1) foram submetidas a teste de sanidade para avaliação da incidência de *Fusarium* spp. após tratamento de assepsia superficial. Os dados revelaram alta variabilidade em relação à incidência (em porcentagem de sementes analisadas) de *Fusarium* spp. entre as amostras, a qual variou significativamente ($P < 0,01$) de 51,5 a 2%. A maior incidência de *Fusarium* spp. foi registrada na amostra PR-7 procedente de Paraná, mas, que não diferiu de amostras dos outros estados, a exceção das amostras de Minas Gerais cujas médias apresentaram menores valores de incidência (Tabela 2). Destas, a amostra (MG-3) identificada como de semente bruta, o que para a indústria sementeira define uma semente sem beneficiamento, apresentou 8,25 % de incidência de *Fusarium* spp., diferindo daquelas com os valores mais altos de incidência, o qual sugere um manejo adequado no campo de produção de origem desta amostra. De modo geral, as maiores incidências de *Fusarium* spp. foram registradas em amostras do sul do país, representada pelos estados Paraná (PR) e Rio grande do sul (RS). No entanto, o reduzido número de amostras por região não possibilita nenhuma inferência sobre a ocorrência deste fungo em função da origem geográfica das amostras (Tabela 2).

Com relação a ano de colheita e, por conseguinte, tempo de armazenamento, também foram observadas diferenças entre amostras. Todas as amostras colhidas em 2001 e 2005 agruparam-se com uma incidência bastante baixa. Isto provavelmente se deve à perda de viabilidade do fungo, pois segundo observações de Dias et al. (2005), esta é reduzida após 12 meses de armazenamento das sementes sob condição de ambiente não controlado. Porém, Magalhães et al. (2009), observaram aumento da incidência de *Fusarium* spp. no decorrer do tempo de armazenamento das sementes de milho em embalagem de plástico e em embalagem de algodão sob ambiente não controlado.

O acondicionamento das sementes desde o campo de produção até o beneficiamento reflete em sua qualidade sanitária. Neste estudo, a alta variabilidade na incidência de *Fusarium* spp. entre as amostras avaliadas pode estar relacionada ao efeito de vários fatores como ambientais, manejo da cultura nos campos de produção e as condições de beneficiamento (DHINGRA, 2005).

Tabela 1 - Dados sobre a procedência das amostras de sementes analisadas neste estudo

Amostra	Local de coleta	Ano de coleta	Época de plantio	Identificação lote
SP-1	Guaira-SP	2007	Safra	2B710
MG-2	Janaúba-MG	2006	Safrinha	SW-06
MG-3	Paracatú-MG	2006	Safrinha	S Bruta
BA-4	Bahia	2006	Safra	S Bruta
BA-5	Bahia	2006	Safrinha	SW-06
PR-6	Pato Branco-PR	2007	Safra	SG-6418
PR-7	Pato Branco-PR	2007	Safra	SG-150
RS-8	Santa Cruz-RS	2001	Safra	30F44
RS-9	Santa Cruz-RS	2001	Safra	30F44
RS-10	Cruz Alta-RS	2007	Safra	30F53
RS-11	Santo Augusto-RS	2005	Safra	30F53
RS-12	Santo Augusto-RS	2007	Safra	30F53
RS-13	Cruz Alta-RS	2007	Safra	30F53
RS-14	Cruz Alta-RS	2007	Safra	30F53
MS-15	Bandeirantes-MS	2007	Safra	Bus-Sol Amanhã
MS-16	Bandeirantes-MS	2007	Safra	Al-Bandeirante
MS-17	Bandeirantes-MS	2007	Safra	Br-106
MS-18	Rio Brilhante-MS	2007	Safra	DG-504

Tabela 2 - Incidência de *Fusarium* spp.. em sementes de milho produzidas no Brasil submetidas a assepsia superficial

Amostra de semente	Incidência <i>Fusarium</i> spp.. (%)	Amostra de semente	Incidência <i>Fusarium</i> spp.. (%)
PR-7	51,50 ^a	MS-15	12,50bcdefg
RS-13	46,00ab	RS-11	8,50cdefg
RS-12	42,50ab	MG-3	8,25cdefg
BA-5	42,25abc	RS-9	7,50defg
PR-6	35,00abcd	RS-10	6,50efg
MS-16	28,50abcde	RS-8	5,75efg
MS-17	28,50abcde	MS-18	5,50efg
BA-4	26,75abcde	MG-2	3,00fg
SP-1	21,25abcdef	RS-14	2,00g
CV(%) = 29,61			

A incidência de patógenos veiculados pelas sementes é uma importante variável para o estabelecimento de índices referenciais tais como o limite de tolerância, definido como a incidência de um patógeno na semente acima da qual as perdas causadas pelo uso desse lote são inaceitáveis (DHINGRA, 2005; MACHADO; POZZA, 2005) e o padrão sanitário de sementes definido por Casa et al. (2005); Menten (1991), como o indicativo da relação entre a incidência do patógeno nas sementes e a taxa de transmissão.

No caso de *Fusarium* spp. o padrão de sanidade de sementes também é um valor referencial na tomada de decisão referente à adoção de medidas de controle adicionais como acontece no milho quando são detectados fungos causadores da podridão do colmo (CASA et al., 2005). Machado e Pozza (2005) apontam as possíveis consequências tanto no campo quanto na pós-colheita da associação patógenos-semente, as quais justificam o estabelecimento de padrões sanitários de sementes, mas, os autores não consideram a contaminação por espécies fúngicas toxigênicas como é o caso de *Fusarium* spp. do complexo *G. fujikuroi* que, apesar de não serem quarentenários, , são importantes pois são transmitidos de forma sistêmica até a espiga, lá produzindo metabólitos secundários que contaminam o grão e causam problemas de saúde animal e humano. Neste sentido, são necessários estudos que suportem o estabelecimento de padrões sanitários de sementes para estas espécies toxigênicas e gerar evidências científicas sobre a

relevância de sua transmissão sistêmica à planta e o impacto no acúmulo de toxinas no grão. Um exemplo deste tipo de trabalho foi feito por Sartori et al. (2004) que, partindo de uma incidência natural de *F. moniliforme* de 46%, encontraram uma transmissão de 34,9%, 23,6%, 7,2% e 14,6% das sementes para raiz principal, entrenó subcoronal, coleóptilo e base da folha, respectivamente, o qual indicou uma redução da associação do fungo com a planta no sentido da base ao ápice.

Os resultados das análises de sanidade de sementes do presente estudo revelam essa necessidade, pois, sendo as amostras provenientes de campos de produção certificados, acredita-se que tenham recebido tratamentos satisfatórios de beneficiamento e inspeção da qualidade. No entanto, mesmo assim, os níveis de incidência de *Fusarium* spp. foram elevados e diferentes entre lotes.

4.2 Isolamento de *Fusarium* spp. da semente

Cem isolados foram obtidos a partir da análise de sanidade das amostras de sementes colhidas em diferentes zonas do Brasil (Tabela 3). O maior número de isolados foi obtido da região sul, especificamente do Estado Rio Grande do Sul, pois esta região contribuiu com o maior número de amostras.

Tabela 3 - Identificação e origem de isolados monospóricos de *Fusarium* spp. oriundos de sementes de milho híbrido

Região	Estado	Amostra	Isolado	Região	Estado	Amostra	Isolado
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fv-1	Sul	Rio Grande do Sul	RS-8	Fv-51
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fv-2	Sul	Rio Grande do Sul	RS-8	Fv-52
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fp-3	Sul	Rio Grande do Sul	RS-8	Fv-53
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fv-4	Sul	Rio Grande do Sul	RS-9	Fv-54
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fv-5	Sul	Rio Grande do Sul	RS-9	Fv-55
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fv-6	Sul	Rio Grande do Sul	RS-9	Fv-56
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fv-7	Sul	Rio Grande do Sul	RS-9	Fp-57
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fv-8	Sul	Rio Grande do Sul	RS-9	Fv-58
Sudeste	São Paulo	SP-1	Fv-9	Sul	Rio Grande do Sul	RS-9	Fv-59
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-10	Sul	Rio Grande do Sul	RS-9	Fv-60
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-11	Sul	Rio Grande do Sul	RS-10	Fv-61
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-12	Sul	Rio Grande do Sul	RS-10	Fv-62
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-13	Sul	Rio Grande do Sul	RS-11	Fv-63
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-14	Sul	Rio Grande do Sul	RS-11	Fv-64
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-15	Sul	Rio Grande do Sul	RS-11	Fv-65

Tabela 3 - Identificação e origem de isolados monospóricos de *Fusarium* spp. oriundos de sementes de milho híbrido (conclusão)

Região	Estado	Amostra	Isolado	Região	Estado	Amostra	Isolado
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-16	Sul	Rio Grande do Sul	RS-11	Fv-66
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-17	Sul	Rio Grande do Sul	RS-11	Fv-67
Sudeste	Minas Gerais	MG-2	Fv-18	Sul	Rio Grande do Sul	RS-12	Fv-68
Sudeste	Minas Gerais	MG-3	Fv-19	Sul	Rio Grande do Sul	RS-12	Fv-69
Nordeste	Bahia	BA-4	Fv-20	Sul	Rio Grande do Sul	RS-12	Fv-70
Nordeste	Bahia	BA-4	Fv-21	Sul	Rio Grande do Sul	RS-12	Fv-71
Nordeste	Bahia	BA-4	Fv-22	Sul	Rio Grande do Sul	RS-12	Fv-72
Nordeste	Bahia	BA-4	Fv-23	Sul	Rio Grande do Sul	RS-12	Fv-73
Nordeste	Bahia	BA-4	Fv-24	Sul	Rio Grande do Sul	RS-13	Fs-74
Nordeste	Bahia	BA-4	Fv-25	Sul	Rio Grande do Sul	RS-13	Fv-75
Nordeste	Bahia	BA-4	Fv-26	Sul	Rio Grande do Sul	RS-13	Fv-76
Nordeste	Bahia	BA-5	Fv-27	Sul	Rio Grande do Sul	RS-13	Fv-77
Nordeste	Bahia	BA-5	Fv-28	Sul	Rio Grande do Sul	RS-14	Fv-78
Sul	Paraná	PA-6	Fv-29	Sul	Rio Grande do Sul	RS-14	Fv-79
Sul	Paraná	PA-6	Fv-30	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-15	Fv-80
Sul	Paraná	PA-6	Fv-31	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-15	Fv-81
Sul	Paraná	PA-6	Fv-32	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-15	Fv-82
Sul	Paraná	PA-6	Fv-33	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-83
Sul	Paraná	PA-6	Fv-34	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fp-84
Sul	Paraná	PA-6	Fv-35	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-85
Sul	Paraná	PA-7	Fv-36	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-86
Sul	Paraná	PA-7	Fv-37	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-87
Sul	Paraná	PA-7	Fv-38	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-88
Sul	Paraná	PA-7	Fv-39	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-89
Sul	Paraná	PA-7	Fv-40	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-90
Sul	Paraná	PA-7	Fv-41	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-91
Sul	Paraná	PA-7	Fp-42	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-92
Sul	Paraná	PA-7	Fv-43	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-16	Fv-93
Sul	Paraná	PA-7	Fv-44	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-17	Fv-94
Sul	Paraná	PA-7	Fv-45	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-17	Fv-95
Sul	Paraná	PA-7	Fv-46	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-17	Fv-96
Sul	Paraná	PA-7	Fv-47	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-17	Fv-97
Sul	Paraná	PA-7	Fs-48	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-18	Fv-98
Sul	Rio Grande do Sul	RS-8	Fv-49	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-18	Fv-99
Sul	Rio Grande do Sul	RS-8	Fv-50	Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	MS-18	Fsp-100

4.3 Caracterização cultural e morfológica dos isolados de *Fusarium* spp.

4.3.1 Caracterização cultural

Neste estudo, os resultados do índice de crescimento não se ajustaram à normalidade, sendo necessária a análise não paramétrica por Kruskal-Wallis. Os resultados indicaram que não houve diferenças ($P>0.05$) em índices de crescimento entre isolados em meio BDA, não diferindo dos resultados obtidos por Machado (2002) para *F. moniliforme* submetido a restrição hídrica em meio BDA+Manitol. Segundo Seifert (1996), esta é uma característica mais adequada para diferenciar espécies das seções Eupionnotes e Arachnites das espécies de outras seções por estas apresentarem um crescimento lento.

A cor e aspecto do micélio foram muito variáveis entre isolados e ainda entre cultivos do mesmo isolado feitos a partir de esporos provenientes da mesma colônia (Figura 1). Alguns isolados apresentaram micélio abundante numa cultura e escasso em outra. A cor variou desde o branco rosado, passando ao laranja salmão até o roxo, tanto no micélio quanto no fundo do meio de cultura. Para Seifert (1996), a cor desenvolvida no verso da colônia em meio de cultura BDA incubada a 25°C entre 7-10 dias auxilia na identificação de espécies agrupadas na seção Liseola (atual complexo *G. fujikuroi*) quando a pigmentação é roxa. Na atualidade, devido às constantes variações apresentadas por estas espécies em meios artificiais esta característica não apresenta importância para efeitos taxonômicos.

Figura 1 - Características das colônias de isolados de *Fusarium* spp. crescendo em meio de cultura BDA. **a1, a2, a3.** *F. verticillioides*; **b1, b2, b3.** *F. proliferatum*. **c1, c2.** *F. subglutinans*. **c3.** *Fusarium* sp

4.3.2 Caracterização e identificação morfológica dos isolados de *Fusarium* spp.

As condições de incubação das culturas não favoreceram o desenvolvimento da fase teleomórfica. Porém, a avaliação das características anamórficas, segundo Nelson et al. (1983), permitiu alocar todos os isolados na seção Liseola, na atualidade chamado complexo *G. fujikuroi* (LESLIE; SUMMERELL, 2006; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998).

A presença ou ausência de clamidósporo é a característica que determina a inclusão de uma espécie no complexo *G. fujikuroi*. Esta é a estrutura típica do gênero *Fusarium* (NELSON et al., 1983), mas, no entanto, espécies do complexo *G. fujikuroi* não a produzem. Por isto, esta foi a primeira característica avaliada, mostrando que a totalidade dos isolados não formaram esta estrutura e que, portanto, pertencem a espécies deste complexo.

A ausência de clamidósporo, aliada à produção de esporodóquios de coloração alaranjada em folhas de craveiro com 10 a 20 dias de crescimento, alojando macroconídios com 3 – 5 septos predominando 3, com paredes delgadas e curvatura dorso-ventral; e a presença de microconídios abundantes dispostos em cadeias e/ou falsas cabeças são características consideradas nas chaves sinópticas para identificação da sessão Liseola. Neste estudo, noventa isolados formaram esporodóquios. Nos dez restantes, os macroconídios foram avaliados quando formados em micélio aéreo, ainda que em baixa quantidade, e apresentaram formato semelhante aos de origem esporodoquial, com predominância de 3 septos e disposição da célula basal em falso pé e a célula apical ligeiramente curva (Figura 2e).

Todos os isolados apresentaram microconídios unicelulares, ovais e dispostos em falsa cabeça. Além disto, a maioria (97%) produziu estes esporos na forma de cadeias, indicando se tratar de *F. verticillioides* ou *F. proliferatum*, já que *F. subglutinans* não produz esporos em cadeia.

Alguns isolados apresentaram microconídios bicelulares. Acredita-se que os esporos de tipo microconídios que apresentam septo são na verdade ascósporos, mas, neste caso, para o 98% dos isolados, não foi observado formação de peritécios no período de avaliação considerado e só foi possível observar esta estrutura com os ascos carregando os ascósporos bicelulares nas culturas dos isolados Fv-BA25 e Fv-MS80 em meio BDA e em folhas de craveiro repetidas vezes aos 30 a 60 dias após início do desenvolvimento da colônia (Figura 2f).

A fim de distinguir isolados das espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, as células conidiogênicas foram caracterizadas em tipo monofiálides e/ou polifiálides (Figura 2a, 2b). O tipo

de célula conidiogênica é uma estrutura chave para distinguir *F. verticillioides* de *F. proliferatum*, pois polifiálides não são produzidas pela primeira espécie e o são pela segunda, além de *F. subglutinans* (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os dois tipos de células conidiogênicas foram observados sobre conidióforos simples e ramificados; monofiálides foram observados em setenta e sete isolados e as polifiálides em vinte e dois. Destes, vinte desenvolveram microconídios em cadeia confirmando a espécie *F. proliferatum*, e os outros dois foram identificados como *F. subglutinans*. Esta espécie, apesar de não apresentar diferenças muito visíveis com *F. verticillioides* e *F. proliferatum* já que pode formar tanto mono como polifiálides, apresenta uma característica distintiva de fácil visualização que é a disposição dos microconídios sobre a fiálide, que ocorre somente sobre falsas cabeças. Por fim, apenas um isolado (Fsp-MS100) não pôde ser identificado em nível de espécie com base nos critérios aqui considerados.

Figura 2 - Estruturas morfológicas de isolados de *Fusarium* spp. (40x). **a.** microconídiomicroconídios em cadeia e falsa cabeça sobre monofiálide. **b.** Célula conidiogênica tipo polifiálide **c.** célula conidiogênica semelhante a polifiálide. **d.** Esporodóquio laranja, escleródio sobre folha de craveiro. **e.** Macroconidio formado em esporodóquio. **f.** Asco com ascósporos. **g.** Engrossamento de hifas

Para *F. subglutinans* as dimensões dos microconídios variaram de 2,23 – 6,37 x 1,0– 1,59 µm e dos macroconídios de 10,83 – 28,03 x 1,27 – 1,91 µm, sendo em todos os casos inferiores aos resultados obtidos por Morales et al. (2007) para esta espécie. Neste estudo, as dimensões dos macronídios obtidas para *F. subglutinans* são coincidentes com as dimensões de estruturas nomeada por Morales et al. (2007) como mesoconidio, termo não usado aqui porque a literatura empregada para auxílio na identificação das espécies não usa. As dimensões dos microconídios de *F. verticillioides* (1,91–4,46 x 1,00–1,59 µm; 4,46–5,73 x 1,59–3,18 µm) e de *Fusarium proliferatum* (2,23–4,78 x 1,0–1,59 µm; 2,87 – 4,46 x 1,27 µm) foram muito próximas; já as dimensões dos macroconídios foram discordantes entre estas espécies, sendo os produzidos por *F. verticillioides* (28,66–54,14 x 1,27–2,55 µm) maiores que os de *F. proliferatum* (9,83–19,43 x 1,0–1,27 µm) (Tabela 6). Como as chaves sinópticas utilizadas neste estudo não utilizam estas medidas como critério classificatório, as discrepâncias entre os dois estudos não refletem alterações significativas na identificação dos isolados. O intuito de analisá-las foi apenas o de comparar informações de isolados brasileiros com isolados de outras localidades.

Tabela 4 - Marcadores morfológicos para a identificação de *Fusarium* spp.. do complexo *G. fujikuroi*

(continua)

Isolado	Tipo de microconídio		Disposição dos microconídios		Célula conidiogênica		Espécie morfológica	Confirmação PCRs
	Unicelular	Bicelular	Cadeia	Falsa cabeça	Monofiálide	Polifiálide		
Fv-SP01	+	+	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-SP02	+	+	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fp-SP03	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. proliferatum</i>
Fv-SP04	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-SP05	+	+	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-SP06	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-SP07	+	+	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-SP08	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>
Fv-SP09	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG10	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG11	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG12	+	+	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG13	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG14	+	+	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG15	+	+	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG16	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG17	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>

Tabela 4 - Marcadores morfológicos para a identificação de *Fusarium* spp.. do complexo *G. fujikuroi*

(continuação)

Isolado	Tipo de microconídio		Disposição dos microconídios		Célula conidiogênica		Espécie morfológica	Confirmação PCRs
	Unicelular	Bicelular	Cadeia	Falsa cabeça	Monofiálide	Polifiálide		
Fv-MG18	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MG19	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA20	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA21	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA22	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA23	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA24	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA25	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA26	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA27	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-BA28	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR29	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR30	+	+	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR31	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR32	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR33	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-pr34	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>

Tabela 4 - Marcadores morfológicos para a identificação de *Fusarium* spp.. do complexo *G. fujikuroi*

(continuação)

Isolado	Tipo de microconídio		Disposição dos microconídios		Célula conidiogênica		Espécie morfológica	Confirmação PCRs
	Unicelular	Bicelular	Cadeia	Falsa cabeça	Monofiálide	Polifiálide		
Fv-PR35	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR36	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR37	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR38	+	-	+	+	+	-	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR39	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR40	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR41	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fp-PR42	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. proliferatum</i>
Fv-PR43	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR44	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR45	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR46	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR47	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-PR48	+	-	-	+	+	+	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. subglutinans</i>
Fv-RS49	+	+	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS50	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS51	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>

Tabela 4 - Marcadores morfológicos para a identificação de *Fusarium* spp.. do complexo *G. fujikuroi*

(continuação)

Isolado	Tipo de microconídio		Disposição dos microconídios		Célula conidiogênica		Espécie morfológica	Confirmação PCRs
	Unicelular	Bicelular	Cadeia	Falsa cabeça	Monofiálide	Polifiálide		
Fv-RS52	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS53	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS54	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS55	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS56	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fp-RS57	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. proliferatum</i>
Fv-RS58	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS59	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS60	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS61	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS62	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS63	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS64	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS65	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS66	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS67	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS68	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>

Tabela 4 - Marcadores morfológicos para a identificação de *Fusarium* spp.. do complexo *G. fujikuroi*

(continuação)

Isolado	Tipo de microconídio		Disposição dos microconídios		Célula conidiogênica		Espécie morfológica	Confirmação PCRs
	Unicelular	Bicelular	Cadeia	Falsa cabeça	Monofiálide	Polifiálide		
Fv-RS69	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS70	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS71	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS72	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS73	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fs-RS74	+	-	-	+	+	+	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. subglutinans</i>
Fv-RS75	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS76	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS77	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS78	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-RS79	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS80	+	+	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS81	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS82	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS83	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS84	+	-	+	+	+	+	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. proliferatum</i>
Fv-MS85	+	+	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>

Tabela 4 - Marcadores morfológicos para a identificação de *Fusarium* spp.. do complexo *G. fujikuroi*

(conclusão)

Isolado	Tipo de microconídio		Disposição dos microconídios		Célula conidiogênica		Espécie morfológica	Confirmação PCRs
	Unicelular	Bicelular	Cadeia	Falsa cabeça	Monofiálide	Polifiálide		
Fv-MS86	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS87	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS88	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS89	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS90	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS91	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS92	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS93	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS94	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS95	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS96	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS97	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS98	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS99	+	-	+	+	+	-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
Fv-MS100	+	-		+	+	-	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp

Tabela 5 - Comparação da identificação morfológica e molecular de isolados de *Fusarium* spp. associados às sementes de milho produzidas no Brasil

Espécie	Critério Morfológico	Critério Molecular	% verificado
<i>F. verticillioides</i>	77	77	100,00
<i>F. proliferatum</i>	20	4	20,00
<i>F. subglutinans</i>	2	2	100,00
<i>Fusarium</i> sp.	1	-	-

Tabela 6 - Dimensões dos microconídios e macroconídios de *Fusarium* spp. avaliados neste estudo

Espécie	Microconídio em cadeia (C x L) (μ m)	Microconídio em falsa cabeça (C x L) (μ m)	Macroconídio em esporodóquio (C x L) (μ m)	Nº de septos em macroconídio
<i>F. verticillioides</i>	3,5-12,1 x 0,6-1,6	3,8-12,7 x 0,6-1,9	18,45-34,3 x 8,9-1,0	3
<i>F. proliferatum</i>	2,2-8,6 x 0,6-1,6	2,2 -8,0 x 0,6-2,2	12,50-45,2 x 1-11,8	3
<i>F. subglutinans</i>	-	1,6-6,4 x 2,2-1,0	17,43-28,0 x 1-10,8	3
<i>Fusarium</i> sp.	-	4,14-1,46 x 0,96-1,59	16,00-20,7 x 1,6	4

Segundo Leslie et al. (2006) a formação de escleródios, embora não tenha importância taxonômica, podem ser um indicativo de alto nível de fertilidade. Para estes autores, esta estrutura é observada tanto em *F. proliferatum* quanto em *F. verticillioides*. Observações deste estudo são coincidentes com as destes autores para oito isolados (10,39%) de *F. verticillioides* e dois isolados (10,00%) de *F. proliferatum* (Tabela 7). Neste caso, foram observados, durante período de avaliação de 7 a 15 dias, aglomerados de hifas que não alcançam a formar o corpo de frutificação e tornam-se uma estrutura esclerosada de cor escura, sem esporos em seu interior e desenvolvidos geralmente acima dos esporodóquios característicos das espécies do complexo *G. fujikuroi*, (Figura 2d).

Tabela 7 - Porcentagem de isolados com características morfológicas semelhantes

Espécie	Isolados com esporodóquios de cor laranja (%)	Isolados formando escleródios (%)	Isolados com microconídio bicelular (%)
<i>F. verticillioides</i>	100	10.39	10,52
<i>F. proliferatum</i>	100	10,00	14,29
<i>F. subglutinans</i>	100	50	0
<i>Fusarium</i> sp.	100	0	0

A exemplo do relatado por Leslie et al. (2006), isolados aqui identificados como *F. proliferatum* e *F. verticillioides* produziram engrossamentos na hifa semelhantes a clamidósporos (Figura 2g). A ocorrência das espécies identificadas neste estudo já foi reportada no Brasil associadas à cultura de milho, principalmente como agentes causais de grãos ardidos. Ottoni (2008) reportou as espécies *F. verticillioides* e *F. subglutinans* associadas a grãos ardidos em incidências de 82% e 3%, respectivamente e não relatou a presença de *F. proliferatum*. Também, em estudo similar realizado por Pinto et al. (2007), *F. subglutinans* foi relatada como única espécie associada a grãos ardidos e produção de fumonisinas com uma incidência de 55% – 99% em grãos de 36 cultivares testados. Estes resultados discordantes podem ser devido ao fato de que os autores não indicaram os critérios utilizados para a identificação da espécie, o que pode ter levado a identificações errôneas.

No presente estudo, a distribuição das espécies resultou em 77% *F. verticillioides*, 20% *F. proliferatum*, 2% *F. subglutinans* e 1% *Fusarium* sp. (Tabela 5), evidenciando, mais uma vez, a alta frequência da associação *F. verticillioides*–milho, sendo coincidentes com resultados de estudos anteriores, como é o caso de Rahjoo et al. (2008) em plantios de milho para sementes no Irã, que determinaram, através da análise de caracteres morfológicos, que de um total de 191 isolados avaliados, 140 foram identificados como *F. verticillioides*, 47 como *F. proliferatum*, e o resto não foi identificado. Os resultados deste estudo também concordam com levantamentos recentes realizados no país e no México, nos quais *F. verticillioides* foi predominante (MORALES, 2007; OTTONI, 2008).

4.4 Identificação molecular de *Fusarium* spp.

O DNA dos 100 isolados foi usado em reações de PCR com o intuito de confirmar os resultados da identificação morfológica mediante o uso de marcadores moleculares específicos para cada espécie sob estudo. Os setenta e sete isolados classificados morfológicamente como *F. verticillioides* amplificaram um produto de 578pb com o primer específico desenvolvido para esta espécie (Figura 3). Além destes, outros 16 isolados identificados morfológicamente como *F. proliferatum* (de um total de vinte), também amplificaram com este primer, totalizando noventa e três isolados como pertencentes à espécie *F. verticillioides* (Tabela 5). Os quatros isolados restantes de *F. proliferatum* apresentaram fragmentos amplificados com primers específicos para esta espécie, confirmando sua classificação morfológica.

A provável causa da discrepância entre as análises morfológicas e a molecular no caso de *F. proliferatum* pode estar na dificuldade de avaliação da característica que distingue estas duas espécies (produção de esporos em polifiálides). Um exemplo disto é a estrutura ilustrada na figura 2c, a qual foi observada no isolado Fv-SP-07, identificado como *F. proliferatum* pela semelhança desta com a polifiálide, mas, que resultou *F. verticillioides* na confirmação com a identificação molecular.

Figura 3 - Produtos da reação polimerase em cadeias (PCR) com primers específicos para *F. verticillioides* isolados de sementes de milho

Por outro lado, a discrepância pode ser resultado da inespecificidade dos primers para os isolados de *F. proliferatum* do Brasil, uma vez que foram desenvolvidos com base em seqüências parciais do gene calmodulina de isolados europeus (Itália) (MULÉ et al., 2004). Em estudos com isolados do Irã, Rahjoo et al. (2008) também relataram discordâncias entre a identificação morfológica e molecular de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* e concluíram que estes resultados eram esperados, pois os primers usados correspondem a seqüência parciais de genes de isolados oriundos da Europa e Estados Unidos, e os isolados do Irã podem apresentar maior diversidade genética, fato comprovado neste mesmo já que alguns isolados que não amplificaram com primers específicos para *F. proliferatum* e *F. verticillioides* foram confirmados como sendo destas espécies através do sequenciamento do gene que codifica para o fator de alongação (TEF).

Da totalidade dos isolados analisados, apenas dois isolados amplificaram um produto de 631pb com primers específicos para *F. subglutinans*, que coincidiu com a identificação morfológica (Tabela 4).

Curiosamente, um isolado não amplificou para nenhum dos primers usados e também não apresentou marcadores morfológicos das três espécies identificadas, nem de outras espécies do complexo *G. fujikuroi*, a pesar de não ter formado clamidósporos, característica que o aponta como espécie deste grupo (Tabela 4).

Neste estudo foi uma vez mais, esclarecida a importância da combinação de diferentes critérios para a identificação das espécies do gênero *Fusarium*, principalmente dentro do complexo *G. fujikuroi*. Por isto, a identificação molecular é um critério que se tornou indispensável para a identificação de espécies de fungos que apresentam alta variabilidade dentro da espécie, sempre que esta análise seja suficientemente precisa. Para o uso da PCR como técnica de diagnose, é necessário o desenvolvimento e validação de primers a partir de seqüência gênicas de espécimes em desenvolvimento na mesma geografia ocupada pelos espécimes sob estudo porque o uso de marcadores obtidos em condições climáticas diferentes do âmbito de estudo, provavelmente seja em alguns casos o motivo das discrepâncias. Estudos posteriores sobre identificação baseada em outras seqüência gênicas, como caso do gene TEF, provavelmente ajudariam a esclarecer possíveis discrepâncias entre as classificações morfológicas e moleculares de espécies deste gênero.

4.5 Estudo da diversidade genética dos isolados de *Fusarium* com marcadores AFLP

O DNA dos 100 isolados de *Fusarium* spp. foram analisados por AFLP usando 5 combinações de primers (E_AT+M_CA, E_AA+M_AG, E_AG+M_AA, E_AA+M_CC, E_CC+M_CC) que geraram um total de 367 bandas entre 100 e 500 pb (Figura 4). Neste estudo, foram identificados 276 (75,20% do total) fragmentos polimórficos, assumindo como fragmento polimórfico o estado mais comum entre os isolados que compõem o grupo estudado (presente ou ausente) e que estiver presente em menos de 95% dos espécimes (LAURENTIN, 2009). A combinação E_AA+M_AG amplificou o maior número de fragmentos, mas revelou o menor número de fragmentos polimórficos. A combinação E_AT+M_CA detectou o maior número de fragmentos polimórficos (98,46%). Em geral, as combinações de primers usados neste estudo revelaram um alto polimorfismo entre a população sob análise (Tabela 8).

O dendrograma resultante do agrupamento dos dados obtidos dos haplótipos AFLP de cada isolado se apresenta na figura 5. A análise de agrupamentos mostrou uma similaridade genética entre pares de isolados que variou de 0,13 a 0,94. Considerando um índice de similaridade superior de 0,40, foram observados dois grandes grupos: o maior (I) agrupando os isolados pertencentes às espécies *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *Fusarium* sp. e outro grupo (II) com isolados da espécie *F. proliferatum*. Espécies de outros gêneros de fungos (*Cercospora maydis*, *Curvularia* sp. e *Monilinia* sp) foram incluídas na análise simplesmente para enraizar a árvore. A correlação cofenética resultante foi de 0,97, indicando que houve pouco desvio entre os dados originais da matriz de similaridade e os dados utilizados para construção do dendrograma, o que significa que esta explica adequadamente os dados biológicos.

Figura 4 - Padrão de AFLP gerado a partir de 5 combinações de primers (E_AT+M_CA, E_AA+M_AG, E_AG+M_AA, E_AA+M_CC, E_CC+M_CC) na análise de 100 isolados de *Fusarium spp.* (complexo *G. fujikuroi*)

Tabela 8 - Lista de combinações de primers usados para determinar por AFLP a diversidade genética de *Fusarium spp.* (*G. fujikuroi*) presentes em sementes

Combinação de Primers	Total Bandas/Primer	Bandas polimórficas	Porcentagem de polimorfismo
E_AA+M_CC	43	37	86,05
E_AA+M_AG	111	53	47,75
E_AT+M_CA	65	64	98,46
E_AG+M_AA	84	65	77,38
E_CC+M_CC	64	57	89,06
Total bandas	367

Figura 5 - Dendrograma UPGMA para isolados de *Fusarium* spp. do complexo *G. fujikuroi* (Correlação cofenética 0,97) pelo coeficiente de similaridade Dice)

O grupo I pode ser dividido em cinco sub-grupos. O isolado Fs-RS74, identificado previamente como *F. subglutinans* foi diferenciado do resto do grupo, enquanto que isolados de *F. verticillioides* foram agrupados com um índice de similaridade superior a 0,70 em cinco sub-grupos. Dos cinco sub-grupos, o sub-grupo IC foi o mais heterogêneo em termos de origem, pois agrupou isolados de Minas Gerais (MG), Bahia(BA) e Paraná(PR). Os outros grupos foram compostos por isolados provenientes de um mesmo estado. Assim, por exemplo, o sub-grupo IA agrupou os isolados oriundos de São Paulo (SP), o ID agrupou isolados em sua maioria de origem Rio Grande do Sul (RS) com alguns de PR e Mato Grosso do Sul (MS), e o sub-grupo IE, o mais homogêneo, foi composto pela maioria dos isolados de MS e apenas um de RS. Os sub-grupos IA e IB agruparam o menor número de isolados de *F. verticillioides*.

Os resultados indicam, portanto, que isolados de uma mesma região foram geneticamente mais próximos entre si do que entre isolados de outras regiões. No entanto, este resultado deve ser tomado com muita cautela, pois o número reduzido de amostras de cada local não permite inferir que as diferenças observadas entre clusters se devam às variações locais, mas, por outro lado, permitem antever a existência de grande variabilidade genética entre espécies do complexo *G. fujikuroi* associadas ao milho no país.

Os resultados da análise bi-direcional por coordenadas principais foram consistentes com os resultados do dendrograma, coincidindo principalmente com a separação em grupos para as espécies de *Fusarium*, especialmente *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, o qual foi o resultado mais robusto da análise neste estudo (Figura 6). Também permitiram verificar a aproximação dos isolados Fs-PR48 e Fs-RS74 identificados como *F. subglutinans*, os quais, segundo o dendrograma, apresentam uma similaridade genética com *F. verticillioides* próxima de 50%. No entanto, os isolados Fp-SP03, Fp-PR42, Fp-RS57 e Fp-MS84, previamente identificados como *F. proliferatum* foram agrupados em clusters diferentes, com uma similaridade genética de 40% (Figura 5).

Figura 6 - Gráfico da Análise de Coordenadas Principais para 100 isolados de *Fusarium* spp.. (*G. fujikuroi*)

Segundo Silva et al. (2006), a conservação de locos em *F. verticillioides* e *F. subglutinans* mostra duas espécies intimamente relacionadas, apresentando o mesmo haplotipo e conformando um mesmo clado. No presente estudo, isolados desta espécie encontram-se no dendrograma a uma distância genética menor de *F. verticillioides* se comparar com a distância de *F. proliferatum*, o qual se pode associar com a antiga classificação da espécie *F. moniliforme* subsp. *subglutinans*, inferindo uma maior proximidade genética entre estas, pois *F. verticillioides* é a antigamente *F. moniliforme* quando associado ao milho.

Comparando a similaridade genética detectada entre isolados de cada espécie, pode-se evidenciar que a similaridade média entre isolados de *F. verticillioides* foi de 0,70, ao passo que entre isolados de *F. proliferatum* foi de 0,60. Neste caso, provavelmente o pequeno número de isolados não foi representativo de uma população com alta diversidade genética (RAHJOO et al., 2008).

4.6 Seleção de isolados patogênicos para testes de agressividade.

Estudos prévios sustentam a hipótese da existência de uma relação endófito de alguns isolados pertencentes às espécies de fungos agrupadas no complexo *G. fujikuroi*, principalmente de *F. verticillioides*. Estes estabeleceriam uma associação específica com o hospedeiro, alojando-se nas sementes e outras partes da planta em qualquer estágio fenológico resultando numa infecção assintomática (CARROL, 1988, DESJARDINS, 2003, MUNKVOLD; McGEE; CARLTON, 1997). Estes relatos despertaram o interesse de avaliar a capacidade patogênica da coleção de isolados de *Fusarium* spp. provenientes de sementes produzidas em diferentes regiões do Brasil. Neste estudo, os resultados mostraram que 100% dos isolados testados induziram sintomas de podridão do colmo em milho. Não obstante, os resultados mostraram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre isolados, sendo Fv-BA22 e Fv-BA25 os de maior agressividade avaliada pelo comprimento necrótico da lesão no colmo do híbrido AG8060 (resultados não apresentados). No entanto, os outros isolados não mostraram diferenças significativas com estes nem com a testemunha. Os isolados Fv-SP01, Fv-MS94 e Fsp-MS100, produziram lesões menores de 2,75 cm, as quais estatisticamente não diferiram da testemunha.

Os resultados dificultaram a escolha dos isolados para o teste de agressividade, pois somente através da avaliação do comprimento da lesão necrótica foi difícil determinar e diferenciar o grau de patogenicidade dos fungos inoculados. Porém, segundo Schurtleff (1980) e Pereira et al. (2005) existe um conjunto de sintomas característicos que aparecem de forma progressiva à medida que a doença se desenvolve e estes foram observados neste estudo. Estes sintomas vão desde a descoloração da medula, que se torna de esbranquiçada a amarela, passando para cor salmão até marrom, perda da estrutura do colmo, abertura de cavidades, separação das fibras, necrose de internódios superiores e, ao final, quando o colmo não suporta pressão ou peso das espigas, ocorre o prostramento da planta (acamamento). Todos estes sintomas foram observados aos 30 dias após inoculação em todos os isolados. Foi constatado também, que o isolado Fsp-MS100 causou apenas uma lesão amarela, semelhante à descrita como inícios da doença. Este isolado não foi identificado em espécie por critério morfológico nem molecular (MULÉ et al., 2004). No entanto, como todos os isolados incluindo este espécime causaram mudanças na medula do colmo do milho, conclui-se que, nas condições de avaliação deste estudo, nenhum se comportou como endófito quando inoculado no híbrido suscetível AG8060.

Diante estes resultados, a seleção dos isolados para o teste de agressividade foi feita baseada na observação do aparecimento do sintoma terminal da doença, representada pela perda da estrutura do colmo por separação das fibras. Além disto, também foi priorizada a escolha de isolados oriundos de regiões distintas.

4.7 Agressividade de isolados de *F. verticillioides* avaliada em colmos de milho.

A agressividade de 6 estirpes de *Fusarium verticillioides* foi avaliada em dois experimentos (2007- 2008 / 2008 – 2009) através das variáveis severidade da podridão do colmo (SPC), comprimento necrótico (CN) e a incidência de acamamento (IA) de plantas em três híbridos comerciais de milho. Em termo geral, as temperaturas predominantes para os dois períodos de avaliação neste estudo mantiveram-se entre 23 – 25 °C durante o ciclo da cultura, sendo favoráveis tanto para o desenvolvimento da planta quanto do fungo, igualmente, a umidade em média atingiu durante os dois períodos entre 150 e 162 mm, o qual foi desfavorável para a planta tornando-a vulnerável aos patógenos causadores da podridão do colmo. Estes resultados são coincidentes com os de El-Meleigi et al. (1983), apontando a maior incidência da doença quando a umidade no solo foi limitada.

Os resultados da ANOVA para a análise conjunta (dados não apresentados) indicaram ausência de interação entre isolado x híbrido e híbrido x ano ($P>0,05$) tanto para CN como para SPC. No caso da interação isolado x ano, esta foi significativa, o que sugere que o comportamento dos isolados variou em função da época de condução do experimento (Figura 7). Desta forma os resultados foram analisados individualmente por ano. Os resultados também indicaram alta significância para efeito simples dos híbridos ($P<0,01$), o que indica que eles responderam de forma diferente aos isolados inoculados, como esperado, já que possuem níveis contrastantes de resistência.

Apesar de serem catalogados como resistente, parcialmente resistente e suscetível, os 3 foram suscetíveis a todos isolados, porem a ANOVA para a analise conjunta indicou diferenças significativas entre eles (dados não apresentados), sendo o híbrido 2A525 o que apresentou o maior CN (36,26 cm), que resultou significativamente ($P\leq 0,05$) superior aos outros dois híbridos, os quais não se diferenciaram e tiveram valores de 31,49 (2B710) e 29,77 (AG8060) (Tabela 9).

Figura. 7. Efeito de interação isolado x ano no desenvolvimento da lesão necrótica no colmo do milho.

Foi observada uma alta variabilidade nas medidas do CN nos diferentes tratamentos. O aparecimento de sintomas de doenças na testemunha pode ser produto do ferimento ocasionado pela agulha o que possibilita a entrada de inoculo tanto de *Fusarium* como de outros agentes colonizadores do colmo (BORGES et al., 2001), proveniente de outras possíveis fontes de contaminação, tais como partículas de solo, respingos de água, tecidos senescentes adjacentes às plantas controle (MURILLO-WILLIAMS; MUNKVOLD, 2008) ou inoculo do ar (TRIMBOLI et al., 2006). Como não houve interação isolado x híbrido para esta, os resultados apresentados na tabela 9 correspondem aos efeitos independentes de cada fator, sendo que no sentido da coluna se compara o comportamento dos híbridos em relação aos isolados. Nota-se que não houve diferença de CN entre isolados em todos os híbridos e nos dois períodos avaliados, indicando uma agressividade semelhante de todos os isolados causando podridão do colmo, independentemente do híbrido testado neste estudo.

Os resultados obtidos para SPC na primeira safra foram semelhantes aos obtidos na avaliação do CN (Tabela 10), ou seja, todos isolados induziram sintoma típico da doença e apenas se diferenciaram ($P < 0,05$) da testemunha. Na segunda safra, a severidade da podridão do colmo

também mostrou resultados semelhantes às médias de comprimento da lesão necrótica, não havendo diferenças ($P>0,05$) na manifestação da doença em nenhuma das inoculações e nem com a testemunha, a diferença da safra anterior.

Tabela 9 - Comprimento da lesão necrótica causada por isolados de *F. verticillioides* inoculados em três híbridos com diferentes níveis de resistência

Safr 2007 – 2008				Safr 2008 – 2009		
Híbridos				Híbridos		
Isolados	2B710	2A525	AG8060	2B710	2A525	AG8060
Fv-SP02	9.84±1,0828 a A	9.84±1,7703 a AB	10.14±4,4985 a A	9,80±1,8312 a A	10,60±2,8414 a A	6,80±4,6166 a AB
Fv-MG17	11,84±4,4025 ab A	20.98±8,0917 a A	9.38±1,6383 b A	9,73±1,6523 a A	14,18±6,7992 a A	11,15±4,7948 a A
Fv-BA25	9.51±3,9651 a A	15,05±5,6526 a A	8,80±1,3385 a A	8,85±3,3478 a A	13,18±2,6235 a A	9,43±3,0869 a AB
Fv-PR40	12,01±2,0499 a A	16,10±7,1883 a A	9,84±1,3162 a A	10,10±1,0231 a A	14,43±5,3922 a A	8,83±2,0467 a AB
Fv-RS56	7,67±2,3741 a AB	11,50±2,4735 a AB	8,96±2,3393 a A	16,23±5,999 a A	12,40±4,1497 a A	11,33±2,3599 a A
Fv-MS93	9,46±1,6111 a A	12,75±3,9321 a AB	8,21±2,3271 a A	11,53±2,9136 a A	15,60±10,664 a A	13,23±6,1738 a A
T	4,09±2,3827 a B	6.48±1,6292 a B	2,93±2,7318 a B	7,35±1,4821 ab AB	11,58±4,1532 a A	4,88±1,3301 b B
CV(%)	33,59			47,04		

Transformação de dados Safr 2008 – 2009: $Y = \sqrt{x + 1/2}$

Médias com letras minúsculas iguais no sentido das linhas não diferenciam estatisticamente o nível de resistência dos híbridos.

Médias com letras maiúsculas iguais no sentido das colunas não diferenciam estatisticamente a agressividade dos isolados de *F. verticillioides*.

Tabela 10 - Severidade da podridão do colmo do milho causada por isolados de *F. verticillioides* inoculados em três híbridos de milho com diferentes níveis de resistência

Safr 2007 – 2008				Safr 2008 – 2009		
Híbridos				Híbridos		
Isolados	2B710	2A525	AG8060	2B710	2A525	AG8060
Fv-SP02	8,95±0,9854 aAB	7,57±1,3657 aAB	8,81±3,9116 aA	8,91±1,6661 aA	8,15±2,1843 aA	5,91±4,0147 aA
Fv-MG17	10,76±4,0015 aA	16,14±6,2261 aA	8,15±1,4254 aA	8,85±1,5036 aA	10,90±5,2318 aA	9,70±4,1690 aA
Fv-BA25	8,65±3,6021 aAB	11,58±4,3475 aAB	7,65±1,1630 aA	8,04±3,0442 aA	10,14±2,0178 aA	8,20±2,6868 aA
Fv-PR40	10,92±1,8654 aA	12,39±5,5264 aAB	8,55±1,1476 aA	9,18±0,9289 aA	11,10±4,1464 aA	7,67±1,7494 aA
Fv-RS56	6,98±2,1572 aAB	8,85±1,9038 aAB	7,79±2,0352 aA	14,75±4,5430 aA	9,54±3,1948 aA	9,85±2,0507 aA
Fv-MS93	8,60±1,4679 aAB	9,81±3,0277 aAB	7,14±2,0248 aAB	10,48±2,6486 aA	11,99±8,2033 aA	11,50±5,3680 aA
T	3,72±2,1672 aB	4,98±1,2537 aB	2,55±2,3756 aB	6,68±1,3463 abA	8,91±3,1947 aA	2,96±2,7400 bA
CV(%)	32,83			47,47		

Transformação de dados: $Y = \sqrt{x + 1/2}$

Médias com letras minúsculas iguais no sentido das linhas não diferenciam estatisticamente o nível de resistência dos híbridos.

Médias com letras maiúsculas iguais no sentido das colunas não diferenciam estatisticamente a agressividade dos isolados de *F. verticillioides*.

Respeito da incidência do acamamento de plantas aos 120 DAE também foram observadas interações significativas ($P < 0,05$) entre híbridos e isolados para os dois experimentos (Tabela 11). No primeiro, as médias dos tratamentos se separaram em dois grupos estatísticos diferentes em resposta à interação dos fatores híbrido e isolado; assim, os tratamentos híbrido AG8060 (S) inoculado com o isolado Fv-MG17 e os híbridos 2B710 (R) e 2A525 (PR) inoculados com o isolado Fv-BA25 apresentaram os maiores índices de acamamento de plantas. No entanto, o tratamento híbrido AG8060 (S) inoculado com o isolado Fv-PA40 apresentou o menor índice de acamamento de plantas sem diferenças com a testemunha. O resto dos tratamentos não diferiu daqueles com os maiores índices de acamamento (Tabela 11). Em termos gerais, na safra 2007-2008, o híbrido 2A525 obteve a maior porcentagem de acamamento de plantas, seguido do híbrido AG8060.

No segundo experimento, os valores de IA foram maiores em relação ao primeiro. Os tratamentos com as maiores médias de índice de acamamento foram os híbridos 2B710 (R) inoculado com Fv-PR40, o híbrido 2A525 (PR) inoculado com Fv-SP02, Fv-MG17 e Fv-RS56; e o híbrido AG8060 (S) inoculado com Fv-SP02 e Fv-RS56. Estes tratamentos foram diferentes do resto dos tratamentos (Tabela 11). Na segunda safra, observou-se uma situação similar ao ciclo anterior quanto à suscetibilidade dos híbridos ao acamamento.

Tabela 11 - Incidência do Tombamento de plantas devido ao dano causado por isolados de *F. verticillioides* inoculados no colmo de três híbridos de milho com diferentes níveis de resistência

	Safr 2007 – 2008			Safr 2008 – 2009		
	Híbridos			Híbridos		
Isolados	2B710	2A525	AG8060	2B710	2A525	AG8060
Fv-SP02	5,00±2,7735 ab	12,50±5,000 ab	12,50±5,000 ab	22,50±5,000 ab	37,50±5,000 a	32,50±5,000 a
Fv-MG17	10,00±0,000 ab	15,00±5,7735 ab	17,50±5,000 a	12,50±5,000 bcd	42,50±5,000 a	30,00±0,000 abc
Fv-BA25	12,50±5,000 a	17,50±5,000 a	12,50±5,000 ab	7,50±5,000 cd	32,50±5,000 ab	32,50±5,000 ab
Fv-PR40	7,50±5,000 ab	12,50±5,000 ab	2,50±1,000 b	27,50±5,000 a	22,50±5,000 bc	27,50±5,000 abc
Fv-RS56	7,50±5,000 ab	7,50±5,000 ab	7,50±5,000 ab	20,00±0,000 abc	37,50±5,000 a	37,50±5,000 a
Fv-MS93	7,50±5,000 ab	5,00±2,7735 ab	10,00±0,000 ab	17,50±5,000 abcd	32,50±5,000 ab	22,50±5,000 bc
T	0,00±0,000 b	2,50±1,000 b	7,50±5,000 ab	5,00±2,7735 d	17,50±5,000 c	20,00±0,000 c
CV(%)	29,95			9,84		

Médias com letras minúsculas iguais não diferenciam estatisticamente a incidência de acamamento nos tratamentos isolado x híbrido.

Os resultados para a variável incidência do acamamento contrastaram com os resultados para severidade da podridão do colmo, pois houve interação entre isolados e híbridos. Isto pode ser atribuído ao fato do acamamento não ser causado simplesmente por um estresse biótico, como também pela estruturação mecânica do colmo.

Neste estudo estirpes provenientes de sementes assintomáticas causaram sintomas típicos da podridão do colmo, não resultando em nenhum dos casos plantas assintomáticas, porém existem evidências de *F. verticillioides* alojado na semente não ter importância para a posterior colonização de raízes e causar podridão do colmo (EL-MELEIGI et al., 1983; MUNKVOLD; McGEE.; CARLTON, 1997) o que sugere possíveis condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento patogênico dos isolados, além de encontrar-se em altas populações.

Isolados presentes em sementes assintomáticas possivelmente não contribuem diretamente na incidência de podridão do colmo, mas, em contato com os tecidos do colmo se tornam patogênicos e potenciais inoculo para novos plantios. Estes resultados sustentam a importância da semente como meio disseminador de patógenos aos campos de produção.

Para a podridão do colmo do milho o comprimento da lesão necrótica é uma medida de avaliação adequada da severidade da doença, diferente do acamamento o qual resultou uma variável pouco confiável para avaliação da severidade desta doença.

5 CONCLUSÕES

A alta incidência de *Fusarium* spp. em lotes de sementes de milho indicou a associação concomitante da planta e o fungo, pois independente do controle sanitário da semente e as condições de beneficiamento e armazenamento, níveis de 0% incidência não foram encontrados.

As análises morfológicas e moleculares de culturas monospóricas de *Fusarium* isoladas de sementes assintomáticas de milho indicaram a prevalência de *F. verticillioides* em detrimento das duas outras duas espécies do complexo *fujikuroi* patogênicas de milho.

Houve concordância entre as identificações morfológicas e moleculares na maioria dos casos. As discrepâncias apresentadas para a espécie *F. proliferatum*, evidenciou a dificuldade para a identificação desta espécie.

A análise de diversidade genética de isolados baseada na técnica AFLP evidenciou a elevada diversidade genética entre isolados de *F. verticillioides* e corroborou a separação entre *F. verticillioides* e *F. proliferatum* com um índice de similaridade de 0,40. Por outro lado, as análises não deram suporte à distinção entre *F. verticillioides* e *F. subglutinans*.

Isolados de *F. verticillioides* provenientes de sementes assintomáticas causaram podridão do colmo em milho e não apresentaram variação em agressividade frente a três híbridos diferenciados na resistência à doença.

REFERENCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- ANGELOTTI, F.; TESSMANN, D.J.; ALVES, T.C.A.; VIDA, J.B.; JACCOUD FILHO, D.S.; HARAKAVA, R. Morphological characterization and molecular identification of *Fusarium graminearum* isolates associated with fusarium head blight in wheat and triticale in Southern Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 177-179, 2006.
- BARRETO, F.M. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, p. 9-12, 1967.
- BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew; Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 233 p.
- BORGES, M.F.; RESENDE, M.L.V.; VON PINHO, R.G. Inoculação artificial de colmos de milho em diferentes idade e concentrações de inoculo e sua relação com a expressão da resistência a *Fusarium moniliforme*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 715-720. 2001.
- CALDARI J. P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- CARROL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from pathogens to mutualistics symbiont. **Ecology**, London, v. 69, p. 2-9, 1988.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; MOREIRA, E.N. Transmissão de fungos em sementes de cereais de inverno e milho: implicações epidemiológicas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, 2005. cap. 3, p. 55-74.
- CASTELLÁ, G.; MUNKVOLD, G.P.; IMERMAN, P.; HYDE, W.G. Effect temperature, incubation period and substrate on production of fusaproliferin by *Fusarium subglutinans* ITEM 2404. **Natural Toxins**, New York, v. 7, n. 4, p. 129-132, 1999.
- CASTRO, L.V.M. de; VELOSO, N.M.M.; PEREIRA, O.J. de; OLIVEIRA, F.L. de. Rendimento industrial e composição química de milho de alta qualidade protéica em relação a híbridos comerciais. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 3, p. 233-242, 2009.
- COTTEN, T.K.; MUNKVOLD, G.P. Survival of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium subglutinans* in maize stalk residue. **Phytopathology**, St.Paul, v. 88, p. 550-555, 1998.
- CRESTE, C.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequence gels by silver staining. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 19, p. 219-306, 2001.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. **Cultivares de milho disponíveis no mercado brasileiro de sementes na safra 2006/07**. Disponível em: <<http://www.apps.agr.br>>. Acesso em: 01 fev. 2010.

DANIELSEN, S.; JENSEN, D.F. Relationship between seed germination, fumonisin content, and *Fusarium verticillioides* infection in selected maize samples from different regions of Costa Rica. **Plant Pathology**, London, v. 47, p. 609-614. 1998.

DENTI, E.A.; REIS, E.M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do Planalto Médio Gaúcho e dos campos gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 585-590, 2003.

DESJARDINS, A.E. Gibberella from A (venaceae) to Z (eae). **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 41, p. 177-198, 2003.

DHINGRA, O.D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, 2005. cap. 3, p. 75-112.

DIAS, C.L.T.; PANIZZI, R.C.; VIEIRA, R.D.; ALTAFIN, G.J. Efeito de *Fusarium moniliforme* na qualidade da semente de milho. **Científica**, Botucatu, v. 33, p. 185-191, 2005.

DIAZ, J.; SILVAR, C.; VARELA, M.M.; BERNAL, A. MERINO, F. *Fusarium* confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. **Plant Pathology**, London, v. 54, p. 773-780, 2005.

DUFAULT, N.S., DE WOLF, E.D., LIPPS, P.E.; MADDEN, L.V. Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 637-644, 2006.

EL-MELEIGI, L.E.; CLAFLIN, L.E.; RANEY, R.J. Effect of seedborne *Fusarium moniliforme* and irrigation scheduling on colonization of root and stalk root tissue, stalk rot incidence, and grain yields. **Crop Science**, Madison, v. 23, p. 1025-1028. 1983.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998. 220 p.

FRENCH, E.B.; HERBERT, T.T. **Métodos de investigación fitopatológica**. San José: IICA, 1980. 289 p.

GATCH, E.W.; MUNKVOLD, G.P. Fungal species composition in maize stalks in relation to european corn borer injury transgenics insect protection. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, p. 1156-1162, 2002

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

GONÇALVES, M.R.; COUTO, A.A. Preparações e observações microscópicas de espécimes fungicos. In: COUTO, A.A.; GONÇALVES, M.R. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. cap. 9, p. 213-214.

HUANG, R.; GALPERIN, M.; LEVY, Y.; PERL-TREVES, R. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility group random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Pathology**, London, v. 46, p. 871-881, 1997.

JENEY, A.; BÉKI, E.; MULÉ, G.; HORNOK, L. Identification of growth stage specific transcript profiles in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi*, mating population D) by cDNA-AFLP analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 110, p. 619-625, 2004.

KASSAWARA, M.M. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 124 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

KWASNA, H.; BATEMAN, G.L. Aberrant growth and conidiation in wild-type cultures of *Fusarium* species from wheat. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 29-34, 2005.

LAURENTIN, H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzendhausen, v. 56, p. 277-292, 2009.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Sydney: Blackwell, 2006. 388 p.

LIMA, C.S.; MONTEIRO, J.H.A.; CRESPO, N.C.; COSTA, S.S.; LESLIE, J.F.; PFENNING, L.H. VCG and AFLP analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 123, p. 17-26, 2009.

MACHADO, J.C. Concept and grouping fungi in relation to seed health testing: an overview. In: MACHADO, J.C.; LONGERAK, C.J.; JACOUD-FLIHO, D.S. (Ed.). **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**. Ottawa: ISTA, 2002. p. 9-18.

MACHADO, J.C.; POZZA, E.A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, 2005. cap. 3, p. 375–398.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001.

MAGALHÃES, A.L.; BRIÃO, M.B.; BRAND, S.C.; DUARTE, V.M. GARCIA, D.; RIBEIRO, L.; SANTOS, V. dos. Qualidade de sementes de milho armazenadas em diferentes embalagens. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2191-2199, 2009.

MARTELLETO, L.A.P.; CASTILHO, A.M.C.; GOES, A. de. Influência da temperatura de incubação no crescimento micelial, na esporulação e na patogenicidade de *Fusarium subglutinans*, agente causal da fusariose do abacaxizeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, p. 242-246, 1998.

MARTHUR, S.B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. Copenhagen, ISTA, 2003.

MATIELLO, R.M. **Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativa de danos na produção**. 2004. 116 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MENTEN, J.O.M. Importância do tratamento de sementes. In: _____. (Ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: FEALQ, 1991. p. 203-224.

MORALES, R.I.; YAÑEZ, M.M.J.; SILVA, R.H.V.; GARCÍA, D.S.G.; GUZMÁN, P.D.A. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 163, p. 31-39, 2007.

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

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

MUNKVOLD, G.P.; McGEE, D.C.; CARLTON, W.M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St Paul, v. 87, n. 2, p. 209-217, 1997.

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

NAZARENO, N.R.X. Avaliação de perdas por podridão de colmo em milho (*Zea mays*) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 82-84, 1989.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. Copenhagen: The MacMillan Press, 1979. v. 1, 835 p.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 226 p.

NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and the combinations within the *Gibberella fujikoro*i species complex. **Mycologia**, Standford, v. 90, p. 434-458, 1998.

NIVALL, R.F.; KOMMEDAHL, T. Saprophytism and survival of *Fusarium moniliforme* in corn stalk. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p. 1233-1235, 1970.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H.I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikoro*i species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, p. 61-78, 2000.

OTTONI, R.J. **Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxigenicos e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido**. 2008. 54 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V.; CAMARGO, A.L.E. Doenças do milho (*Zea mays*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, M.J.A.; BERGAMIN, F.A.; CAMARGO, A.L.E. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Ceres, 2005. cap. 55, p. 477-488.

PFENNING, L.H.; LIMA, C.S. Synoptic keys to *Fusarium* species. In: TROPICAL FUSARIUM WORKSHOP, 2008, Lavras. Lavras: UFLA, Departamento de Fitopatologia, 2008. p. 214-224.

PINTO, N.F.J.A. **Grãos ardidos de milho**. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2005/circular/Circ_66.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2009.

PINTO, N.F.J.A.; VARGAS, E.A.; PREIS, R.A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 304-306, 2007.

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

REYNOSO, M.M.; CHULZE, S.N.; ZELLER, K.A.; TORRES, A.M.; LESLIE, J.F. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 123, p. 207-215, 2009.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.02 (software). Applied Biostatistics. New York: Stone Book, 2000.

SARTORI, F.A.; REIS, E.M.; CASA, R.T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 456-458, 2004.

SCHILLING, A.G.; MOLLER, E.M.; GEIGER, H.H. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 5, p. 515-522, 1996.

SEIFERT, K.A. Enhancing the relevance of fungal taxonomy to plant pathology: phylogenetics, molecular diagnostics, and long-term memory1. Symposium contribution. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 28, p. S280-S287, 2006.

_____. **Fuskey: *Fusarium* interactive key**. Agricultural and Agri-Food Canadá. 1996. Disponível em: <<http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html>>. Acesso em: 01 ago. 2007.

SEIFERT, K.A.; AOKI, T.; BAAYEN, R.P.; BRAYFORD, D.; BURGESS, L.W.; CHULZE, S.; GAMS, W.; GEISER, D.; GRUYTER, D. J.; LESLIE, J.F.; LOGRIECO, A.; MARASAS, W.F.O.; NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K.; RHEEDER, J.P.; SAMUELS, G.J.; SUMMERELL, B.A.; THRANE, U.; WAALWIJK, C. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. Mycological Research News. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 107, n. 6, p. 643-644, 2003.

SHURTLEFF, M.C. **Compendium of corn diseases**. 3rd ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1980. 105 p.

SILVA, V.N.; FERNANDEZ, F.M.C.; CORTEZ, A; RIBEIRO, DHB; ALMEIDA, A.P.; HASSEGAWA, R.H.; CORRÊA, B. Characterization and genetic variability of *F. verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 52, p. 798-804. 2006.

SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; MATHUR, S.B. **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins**. Lyngby: Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1991. 132 p.

SUGA, H.; KARUGIA, G.W.; WARD, T.; GALE, L.R.; TOMIMURA, K.; NAKAJIMA, T.; MIYASAKA, A.; KOIZUMI, S.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, p. 159-166, 2008.

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

TOZZE, J.H.J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

TRIMBOLI, D.S.; BURGESS, L.W. Reproduction of *Fusarium moniliforme* basal stalk rot of grain sorghum in the Greenhouse. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, p. 891-894, 1983.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP - a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 322 p.

WHALLEY, A.J.S. Molecules vs morphology. **Mycological. Research**, Amsterdam, v. 107, n. 6, p. 642, 2003.

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

YAMADA, T.A. A nutrição mineral e resistência das plantas às doenças. **Informações Agronômicas POTAFOS**, Piracicaba, n. 72, p. 1-3, 1995.