

RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA

**DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E ÁCIDO TENUAZÔNICO EM GRÃOS
DE SORGO CULTIVADOS EM DIFERENTES ÉPOCAS DE SEMEADURA
E ESTUDO POLIFÁSICO DE CEPAS DE *Phoma* spp. ISOLADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

RESUMO

OLIVEIRA, R. C. **Distribuição de fungos e ácido tenuazônico em grãos de sorgo cultivados em diferentes épocas de semeadura e estudo polifásico de cepas de *Phoma* spp. isoladas.** 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A cultura de sorgo granífero apresentou significativo aumento de produtividade e área plantada no Brasil, assumindo um papel fundamental como alternativa energética na alimentação animal. Sabe-se que fatores abióticos são determinantes para ocorrência de fungos e micotoxinas nos cereais, especialmente no período de pré-colheita, quando os grãos permanecem expostos às variações destes. Neste contexto e somado a escassez de informações relacionadas aos aspectos micotoxicológicos desta cultura no Brasil, decidimos, através deste estudo: avaliar a distribuição da micobiota e a ocorrência de ácido tenuazônico em diferentes estádios de maturação de grãos de sorgo, cultivados em duas safras (verão e outono); empregar abordagem polifásica na identificação dos isolados de *Phoma* spp., bem como avaliar o potencial toxigênico destes; sequenciar o genoma de *Epicoccum sorghinum* (= *Phoma sorghina*) com a finalidade de identificar o gene responsável pela síntese de ácido tenuazônico (*TASI*); avaliar os efeitos de fatores abióticos, em condições de campo e laboratório, na ocorrência de *E. sorghinum* e ácido tenuazônico. Foi possível observar que *E. sorghinum* foi a espécie mais prevalente nas amostras de grãos de sorgo, com destaque para a maior frequência nas amostras oriundas da safra outono. O ácido tenuazônico foi detectado na totalidade das amostras avaliadas, com maiores níveis nos grãos cultivados na safra verão (média = 587,8 µg/kg). Através do estudo polifásico, foi possível verificar considerável heterogeneidade morfológica e variabilidade genética nas cepas de *E. sorghinum*, apresentando-se como complexo de espécies filogenéticas. O sequenciamento completo do genoma foi realizado com êxito e a presença do gene *TASI* foi confirmada. Avaliando os fatores abióticos ocorridos no campo, bem como acessando a ecofisiologia de *E. sorghinum*, foi possível verificar que condições quentes e úmidas (26 °C; > 0,95 Aa) são favoráveis ao desenvolvimento da espécie e a produção da toxina. Os dados gerados através deste estudo alertam para presença de compostos tóxicos em grãos de sorgo cultivados no país, bem como contribuem com informações aplicáveis para o manejo desta cultura.

Palavras-chave: Micotoxinas. Sorgo granífero. *Phoma*. *Epicoccum sorghinum*. Ácido tenuazônico. Abordagem polifásica.

ABSTRACT

OLIVEIRA, R. C. **Distribution of fungi and tenuazonic acid in sorghum grains cultivated in different growing seasons and polyphasic study of *Phoma* spp. isolates.** 2017. 106 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In the last two decades, Brazilian sorghum has a significant increase of productivity and area, especially because it can be used as an alternative energy source in the animal feed industry. It is known that abiotic factors are determinant for the occurrence of fungi and mycotoxins in cereals, especially in the pre-harvest period, when the grains are exposed to different weather conditions. In this context, and in addition to the scarcity of information related to the mycotoxicological aspects of sorghum crop in Brazil, the aim of this study was: evaluate the mycobiota and the occurrence of tenuazonic acid in different sorghum grain maturity stages cultivated in summer and autumn season; use a polyphasic approach in the identification of *Phoma* spp. isolates, as well as to assess the toxigenic potential of them; sequencing the genome of *Epicoccum sorghinum* (= *Phoma sorghina*) with the purpose of identifying the gene responsible for the tenuazonic acid production (*TASI*); evaluate the effects of abiotic factors under field and laboratory conditions on the occurrence of *E. sorghinum* and tenuazonic acid. *E. sorghinum* was the most prevalent species in sorghum grain samples, with the highest frequency in the samples from the autumn crop. Tenuazonic acid was detected in all the samples, with higher levels in the grain grown in the summer season (mean = 587.8 µg/kg). Through the polyphasic study, it was possible to verify considerable genetic variability in the strains of *E. sorghinum*, presenting as a complex of phylogenetic species. The whole genome sequencing was successfully completed and the *TASI* gene was identified. Evaluating the abiotic factors occurring in the field, as well as accessing the ecophysiology of *E. sorghinum*, it was possible to verify that hot and humid conditions (26 °C, >0.95 Aa) were favorable for the development of the species and the production of the toxin. The data generated by this study alert to the presence of toxic compounds in sorghum grains cultivated in Brazil, as well as contributing with crop management informations.

Keywords: Mycotoxins. Sorghum grain. *Phoma*. *Epicoccum sorghinum*. Tenuazonic acid. Polyphasic approach.

1 INTRODUÇÃO

A produção nacional de sorgo granífero cresceu substancialmente nas últimas décadas, impulsionada, principalmente, pelo aumento na demanda por matérias-primas energéticas destinadas a produção de rações. Durante o desenvolvimento deste cereal no campo, os grãos, formados em uma estrutura denominada de panícula, permanecem expostos a diversos fatores bióticos e abióticos que podem interferir negativamente na obtenção de grãos com boa condição de consumo e mercado.

Dentre estes fatores, podemos destacar a importância dos fungos toxigênicos, que em condições favoráveis, podem produzir compostos tóxicos. Estes compostos são denominados de micotoxinas e, quando ingeridos com os alimentos, são capazes de causar alterações biológicas prejudiciais tanto no homem quanto nos animais (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A síntese destas micotoxinas, bem como a incidência de espécies fúngicas produtoras, sofre influência direta de fatores climatológicos, tais como temperatura e precipitação. Identificar as condições ambientais favoráveis à produção destes compostos no campo, bem como acessar os aspectos ecofisiológicos de espécies fúngicas toxigênicas são ferramentas essenciais na composição de uma estratégia eficaz no controle de micotoxinas.

Entre os escassos relatos micotoxicológicos referentes à cultura do sorgo no país, o gênero *Phoma* é observado como sendo um constituinte majoritário associado à micobiota destes grãos. Em contrapartida, pouco se conhece sobre a biologia deste gênero, principalmente no que tange os aspectos taxonômicos e toxicológicos das espécies presentes nos cereais cultivados no Brasil.

Frente a esta realidade, nosso trabalho teve como principal objetivo acessar a realidade micotoxicológica da cultura de sorgo granífero no período de pré-colheita, avaliando a influência de fatores abióticos na ocorrência de *E. sorghinum* (= *Phoma sorghina*) e ácido tenuazônico (AT). Além disso, buscamos compreender de maneira robusta as características fenotípicas, genéticas e metabólicas das cepas de *E. sorghinum* isoladas dos grãos de sorgo, gerando informações que contribuam para a obtenção de grãos com qualidade, possíveis indicações no manejo dessa cultura e na diminuição das contaminações por micotoxinas.

7 CONCLUSÕES

Através da realização deste estudo, conclui-se que:

- *Epicoccum sorghinum* foi a espécie mais isolada nas amostras de grãos de sorgo, com destaque a elevada e crescente frequência de isolamento a partir do estágio de grão pastoso, especialmente durante a safra de outono.
- A maior frequência de isolamento de *E. sorghinum* nos grãos oriundos da safra outono, parece estar relacionada com a capacidade desta espécie em tolerar condições de estresse hídrico, uma vez que esta espécie foi capaz de, ao menos, se manter viável em baixos níveis de Aa dos grãos.
- Com relação a habilidade toxigênica de *E. sorghinum*, constatou-se que todas as cepas avaliadas foram produtoras de AT, confirmando sua importância para a ocorrência de AT em grãos de sorgo.
- O ácido tenuazônico foi detectado em todos os estágios de maturação dos grãos, concordando com o comportamento crescente da frequência de *E. sorghinum* durante o desenvolvimento dos grãos.
- A maior ocorrência desta toxina foi observada em grãos oriundos da safra verão. Este fato está associado a maior umidade, altos níveis de Aa e a temperatura elevada ocorridos durante este período.
- A abordagem polifásica utilizada neste estudo foi essencial para confirmar a variabilidade intraespecífica das cepas de *E. sorghinum* isoladas no Brasil, sendo possível defini-las como pertencentes a um complexo de espécies filogenéticas.
- O genoma (*de novo*) da espécie *E. sorghinum* apresentou tamanho de 33.4 Mbp e presença do gene responsável pela biossíntese do ácido tenuazônico (*TASI*) foi confirmada.
- As condições ótimas de temperatura e Aa encontradas para o crescimento, expressão do gene *TASI* e produção de enzimas extracelulares de *E. sorghinum*, concordam nitidamente com aquelas ocorridas no campo durante a safra verão, evidenciando que condições climatológicas marcadas por temperaturas elevadas e alta umidade, apresentam-se mais favoráveis a ocorrência de AT.
- *Epicoccum sorghinum* apresenta-se naturalmente associado aos grãos de sorgo e deve ser considerado um agente importante na contaminação destes grãos por AT. O cultivo deste cereal durante períodos com menor precipitação e temperaturas amenas parece ser uma ferramenta eficaz e de baixo custo para o controle desta micotoxina. Além disso, pesquisas na

área de toxicologia se mostram necessárias, a fim de avaliar os riscos, principalmente aos animais confinados, da exposição à esta toxina podem apresentar.

REFERÊNCIAS *

- AHMED, N. E. et al. Fungi associated with stored sorghum grains and their effects on grain quality. **Life Sciences International Journal**, v. 2, n. 3, p. 723–729, 2008.
- ALMEIDA, A. P. et al. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 1–9, 2005.
- ALVES DOS REIS, T. et al. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1445–1451, 30 abr. 2010.
- ANAHOSUR, K. H.; PATIL, S. H. Effect of date of sowing on the incidence of Ergot of sorghum. **Indian Phytopathology**, v. 35, n. 3, p. 507–509, 1982.
- ASAM, S. et al. Development of analytical methods for the determination of tenuazonic acid analogues in food commodities. **Journal of Chromatography A**, v. 1289, p. 27–36, maio 2013.
- ASAM, S.; RYCHLIK, M. Potential health hazards due to the occurrence of the mycotoxin tenuazonic acid in infant food. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 3, p. 491–497, 2013.
- ASTORECA, A. et al. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 60–67, 1 maio 2012.
- AVESKAMP, M. M. et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 363–382, 2009.
- AVESKAMP, M. M. et al. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Mycology**, v. 65, p. 1–60, 2010.
- BANDYOPADHYAY, R. et al. Sorghum Grain Mold: Through the 1990s into the New Millennium. In: **Sorghum and Millets Diseases**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2002. p. 171–183.
- BANDYOPADHYAY, R.; CHANDRASHEKAR, A.; HALL, A. J. **Technical and institutional options for sorghum grain mold management: proceedings of an international consultation**. Parancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2000.
- BERENGUER, M. ; FACI, J. . Sorghum (*Sorghum Bicolor* L. Moench) yield compensation processes under different plant densities and variable water supply. **European Journal of Agronomy**, v. 15, n. 1, p. 43–55, set. 2001.
- BERJARK, P. Report of the Seed Storage Committee-Working Group on the effects of storage fungi on seed viability. **Seed science and technology**, v. 12, p. 233–253, 1984.
- BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical immunology**, v. 81, p. 167–206, 2002.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOEREMA, G. H. et al. **Phoma identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture.** Wallingford: CABI, 2004.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas.** 5. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005.

BOTTALICO, A.; LOGRIECO, A. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: SINHA, K. K.; BHATNAGAR, D. (Eds.). **Mycotoxins in agriculture and food safety.** [s.l.] CRC, 1998. p. 520.

CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. Differences in eukaryotic ribosomes detected by the selective action of an antibiotic. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 319, n. 2, p. 209–215, ago. 1973.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 2012. **CODEX.** Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccc/cocf6/cf06_14e.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **CONAB.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_11_09_00_38_boletim_graos_junho_2015.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2017.

DA SILVA, J. B. et al. Mycoflora and Occurrence of Aflatoxin B 1 and Fumonisin B 1 during Storage of Brazilian Sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4352–4356, 2000.

DANCEY, C. P.; REIDY, J. Análise de correlação: o r de Pearson. In: **Estatística sem matemática para psicologia.** Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 178–226.

DE GRUYTER, J. et al. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. **Mycological Research**, v. 113, n. 4, p. 508–519, abr. 2009.

DE GRUYTER, J. **Revised taxonomy of *Phoma* and allied genera.** [s.l.] Wageningen University, Wageningen, Holanda, 2012.

DE HOOG, G. S. et al. **Atlas of clinical fungi.** 2. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2000.

DE WET, J. M. J. Systematics and Evolution of Sorghum Sect. Sorghum (Gramineae). **American Journal of Botany**, v. 65, n. 4, p. 477, abr. 1978.

DICKO, M. H. et al. Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 384–395, 2006.

DOGGETT, H. Disruptive Selection in Crop Development. **Nature**, v. 206, n. 4981, p. 279–280, 17 abr. 1965.

EMBRAPA.EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Expansão Potencial da Produção de Sorgo Granífero no Brasil no Sistema de Rotação com Soja Considerando o Zoneamento de Risco Climático 2015/16.** Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140133/1/bol-125.pdf>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food.** Disponível

em: <<http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2011.2407>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

FÁVARO, L. C. et al. Polyphasic analysis of Intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e14828, 11 ago. 2011.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the Comparative Method. **The american naturalist**, v. 125, n. 1, p. 1–15, 1985.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

FORBES, G. A.; BANDYOPADHYAY, R.; GARCIA, G. A review of sorghum grain mold. In: **Sorghum and millets diseases: a second world review**. 1. ed. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1992. p. 265–272.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

GARBER, E. D. Cytotaxonomic studies in the genus *Sorghum*. **University of California Publications in Botany**, v. 23, p. 283–362, 1950.

GIAMBRONE, J. J.; DAVIS, N. D.; DIENER, U. L. Effect of tenuazonic acid on young chickens. **Poultry science**, v. 57, n. 6, p. 1554–1558, 1978.

GONZÁLEZ, H. H. L.; MARTÍNEZ, E. J.; RESNIK, S. L. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 35–41, 1997.

GROVE, W. B. **British stem- and leaf-fungi (Coelomycetes)**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1935.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. A Simplified Classification of Cultivated Sorghum1. **Crop Science**, v. 12, n. 2, p. 172, 1972.

HURST, C. J. Introduction to environmental microbiology. In: HURST, C. J. (Ed.). . **Manual of environmental microbiology**. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology, 2001. p. 1–5.

IUPAC. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 1699–1723, 1995.

KILPATRICK, J. A.; CHILVERS, G. A. Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 77, n. 3, p. 497–508, dez. 1981.

KONZEN, E. A.; ALVARENGA, R. C. **Fertilidade de solos: adubação orgânica**. CRUZ, J.C. (Ed.). Cultivo do milho. Sete Lagoas, 2008.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150–63, jun. 2004.

LEBRUN, M. H. et al. Relationships between the structure and the phytotoxicity of the fungal toxin tenuazonic acid. **Phytochemistry**, v. 27, n. 1, p. 77–84, 1988.

LEE, H. B.; PATRIARCA, A.; MAGAN, N. *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. **Mycobiology**, v. 43, n. 2, p. 93–106, jun. 2015.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The fusarium laboratory manual**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.

LIRA, M. **Considerações sobre o potencial do sorgo em Pernambuco**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-DID, 1981.

LOHREY, L. et al. Large-Scale synthesis of isotopically labeled $^{13}\text{C}_2$ -tenuazonic acid and development of a rapid HPLC-MS/MS method for the analysis of tenuazonic acid in tomato and pepper products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 114–120, 9 jan. 2013.

MAGALHAES, P. C.; DURAES, F. O. M.; SCHAFFERT, R. E. **Fisiologia da planta de sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/484470>>. Acesso em: 3 mar. 2017.

MAGAN, N.; MEDINA, A. Integrating gene expression, ecology and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species in relation to interacting environmental factors. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 5, p. 673–684, 2016.

MAKUN, H. A. et al. Fungi and Some Mycotoxins Found in Mouldy Sorghum in Niger State, Nigeria. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 1, p. 5–17, 2009.

MARLEY, P. S. et al. Sorghum Anthracnose and Sustainable Management Strategies in West and Central Africa. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 25, n. 1, p. 43–56, 2005.

MERONUCK, R. A. et al. Tenuazonic Acid, a Toxin Produced by *Alternaria alternata*. **Applied Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 613–617, 1972.

MONTES-BELMONT, R.; MÉNDEZ-RAMÍREZ, I.; FLORES-MOCTEZUMA, E. Relationship between sorghum ergot, sowing dates, and climatic variables in Morelos, Mexico. **Crop Protection**, v. 21, n. 10, p. 899–905, dez. 2002.

MOSS, M. O. MYCOTOXINS. **Nutrition & Food Science**, v. 89, n. 5, p. 8–10, maio 1989.

MURDOCK, G. P. **Africa : its peoples and their culture history**. [s.l.] McGraw-Hill, 1959.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Genome**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>>. Acesso em: 8 mar. 2017.

NAVI, S. S. et al. Effects of wetness duration and grain development stages on sorghum grain mold infection. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 872–878, 2005.

OLIVEIRA, R. C. et al. Enzymatic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates using the API-ZYM[®] system. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 3, p. 210–212, mar. 2013.

OLIVETTI, M.; CAMARGO, A. ASPECTOS ECONÔMICOS E DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DO SORGO. **Informações Econômicas**, v. 27, n. 1, p. 35–48, 1997.

OVIEDO, M. S. et al. Effect of environmental factors on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on soybean-based media. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1186–1192, 2009.

PASCHOLATI, S. F. Fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1995. p. 365–392.

PAŽOUTOVÁ, S. Genetic variation of *Phoma sorghina* isolates from southern Africa and Texas. **Folia Microbiologica**, v. 54, n. 3, p. 217–229, 2009.

PERES, A. et al. Perfil enzimático de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência Agropecuária**, v. 24, n. 1, p. 295–299, 2000.

PITT, J. I. et al. **The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. nuts and oilseeds** *International Journal of Food Microbiology*, 1993.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. Boston, MA: Springer US, 2009.

PRADO, H.; JORGE, J. A.; MENK, J. R. F. **Levantamento pedológico detalhado e caracterização físico-hídrico dos solos da Estação Experimental de Agronomia de Votuporanga (SP)**. 42. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1999.

PRENDES, L. P. et al. Water activity and temperature effects on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Malbec wine grapes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 481–492, fev. 2017.

PROM, L. et al. Mycoflora Analysis of Hybrid Sorghum Grain Collected from Different Locations in South Texas. **American Journal of Experimental Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 10 jan. 2015.

RATNADASS, A. et al. Sorghum head-bugs and grain molds in West and Central Africa: II. Relationships between weather, head-bug and mold damage on sorghum grains. **Crop Protection**, v. 22, n. 6, p. 853–858, jul. 2003.

RING, A. S.; WANISKA, R. D.; ROONEY, L. W. Phenolic compounds in different sorghum tissues during maturation. **Biomass**, v. 17, n. 1, p. 39–49, 1988.

ROSETT, T. et al. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 103. Metabolites of *Alternaria tenuis* auct; culture filtrate products. **The Biochemical journal**, v. 67, n. 3, p. 390–400, 1957.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 317–338, 1993.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–25, jul. 1987.

SCHÉMAEZA, B. et al. Effects of temperature and pH on mycelium growth of *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosch and Van Kesteren in vitro. **Pakistan journal of biological sciences : PJBS**, v. 16, n. 24, p. 2054–7, 15 dez. 2013.

SERT, H. B.; SUMBUL, H. First report of leaf spot caused by *Phoma sorghina* on *Trifolium campestre* in Turkey. **Plant Pathology**, v. 54, n. 2, p. 249–249, abr. 2005.

SHEPHARD, G. S. et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of

- tenuazonic acid and related tetramic acids. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 566, n. 1, p. 195–205, 1991.
- SHIGEURA, H. T.; GORDON, C. N. The biological activity of tenuazonic acid. **Biochemistry**, v. 2, n. 5, p. 1132–1137, 1963.
- SIEGEL, D. et al. Quantification of the alternaria mycotoxin tenuazonic acid in beer. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 902–906, jun. 2010.
- SILVA-LOBO, V. L. DA et al. Influência da adubação nitrogenada, época de plantio e aerospores sobre a severidade da mancha de grãos em arroz de terras altas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 110–115, set. 2011.
- STEYN, P. S.; RABIE, C. J. Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 12, p. 1977–1979, 1976.
- STICKINGS, C. E. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 106. Metabolites of *Alternaria tenuis* auct.: the structure of tenuazonic acid. **The Biochemical journal**, v. 72, n. 2, p. 332–40, jun. 1959.
- SUTTON, B. C. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. **Commonwealth Mycol. Inst., Surrey, England**, p. 696, 1980.
- TSUNECHIRO, A.; MARIANO, R. M.; MARTINS, V. A. Produção e preços de sorgo no Estado de São Paulo, 1991-2001. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 15–24, 2010.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **USDA Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>>. Acesso em: 6 mar. 2017.
- VAQUERA, S.; PATRIARCA, A.; FERNANDEZ, V. Water activity and temperature effects on growth of *Alternaria arborescens* on tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 136–139, 18 ago. 2014.
- VENKATASUBBAIAH, P.; DYKE, C. G. VAN; CHILTON, W. S. Phytotoxic Metabolites of *Phoma sorghina*, a New Foliar Pathogen of Pokeweed. **Mycologia**, v. 84, n. 5, p. 715–723, 1992.
- YEKELER, H. et al. Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 4, p. 492–497, 1 jul. 2001.
- YUN, C.-S. et al. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS–PKS hybrid enzyme. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–9, 2015.