



LARISSA BITENCOURT GOMES

**FILOGENIA MOLECULAR, POTENCIAL TOXIGÊNICO E
PATOGENICIDADE DO COMPLEXO *Fusarium*
chlamydosporum EM ARROZ**

**LAVRAS-MG
2017**

LARISSA BITENCOURT GOMES

**FILOGENIA MOLECULAR, POTENCIAL TOXIGÊNICO E PATOGENICIDADE DO
COMPLEXO *Fusarium chlamydosporum* EM ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, área de concentração
Fitopatologia, para obtenção do título de Doutora.

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

Dr. Emerson Medeiros Del Ponte
Co-orientador

**LAVRAS – MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Gomes, Larissa Bitencourt.

Filogenia molecular, potencial toxigênico e patogenicidade do
complexo *Fusarium chlamydosporum* em arroz / Larissa Bitencourt
Gomes. - 2017.

59 p. : il.

Orientador: Ludwig H. Pfenning.

Co-orientador: Emerson Medeiros Del Ponte.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Oryza sativa*. 2. Tricotecenos. 3. Endófito. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

LARISSA BITENCOURT GOMES

FILOGENIA MOLECULAR, POTENCIAL TOXIGÊNICO E PATOGENICIDADE DO
COMPLEXO *Fusarium chlamydosporum* EM ARROZ

MOLECULAR PHYLOGENY, POTENCIAL FOR PRODUCTION OF MYCOTOXINS
AND PATHOGENICITY OF THE *Fusarium chlamydosporum* SPECIES COMPLEX
ON RICE

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, área de concentração
Fitopatologia, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de Agosto de 2017.

Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dr. Jorge Teodoro de Souza	UFLA
Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. Emerson Medeiros Del Ponte	UFV

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

Dr. Emerson Medeiros Del Ponte
Co-orientador

**LAVRAS – MG
2017**

*Aos meus pais Luiz Carlos Muniz Gomes e Almerita Bitencourt Gomes, irmãos
Luana, Jonatas e Vanessa e demais familiares e amigos, pelo apoio e carinho.
A meu amor e amigo Diogo Mendes Silva pelo incentivo e afeto.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos amigos Diogo Mendes da Silva, Andrea Carvalho, Neilton Araújo, Rafaela Guimarães e Ana Luiza Ribeiro e demais amigos da República GR por me alegrarem nas horas mais difíceis. Gratidão!

Aos meus pais, e a minha irmã Luana, pelos valores que me ensinaram e por sempre me motivarem a continuar em busca dos meus sonhos nas diferentes etapas da minha vida, muito obrigada!

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Dr. Ludwig H. Pfenning e Dr. Emerson Medeiros Del Ponte pela atenção, confiança e orientação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do DFP- UFLA.

Aos pesquisadores, Dr. Cláudio Ogoshi, Dr. Daniel Augusto Schurt e Dr. Klaus Konrad Scheuermann, pela colaboração nas coletas.

À Dra. Eliana Badiale Furlong, da Universidade Federal do Rio Grande, pelas valiosas contribuições na realização das análises de micotoxinas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, especialmente a Camila Primieri Nicolli pela amizade ao longo dos anos, Matheus de Brito Pereira, Bárbara Antônio e Edson Luiz Resende pela colaboração na condução do trabalho e amizade.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO GERAL

Dentre as várias espécies de *Fusarium*, que ocorrem na cultura do arroz, espécies do complexo *Fusarium chlamydosporum* FCSC foram obtidas de amostras de grãos de arroz no Brasil. O objetivo deste estudo foi caracterizar isolados do FCSC por meio de análises filogenéticas moleculares e marcadores morfológicos, avaliar o potencial de produção de micotoxinas e estudar estratégias de colonização e transmissão do fungo em plantas de arroz. Na primeira parte desta Tese, é apresentada uma breve visão geral sobre a cultura do arroz, a história do FCSC e as micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Fusarium*. Na segunda parte, foram avaliadas uma coleção de cerca de 70 isolados do FCSC, obtidos a partir de grãos de arroz em diferentes áreas de produção, por meio de análises filogenéticas de sequências parciais dos genes *Tef-1α*, *Rpb2* e *Cal*, marcadores morfológicos, produção *in vitro* de tricotecenos, nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) e suas formas acetiladas 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON). Foram conduzidos ensaios sobre a colonização e transmissão do fungo e a taxa de germinação de sementes infectadas. Para comparação, 11 isolados de referência foram consideradas nas análises filogenéticas, incluindo o tipo CBS 145.25, coletado de bananeira em Honduras em 1925. As análises das seqüências de *Tef-1α* evidenciaram que os isolados pertencem a três das linhagens filogenéticas conhecidas do FCSC. As sequências das regiões *Cal* e *Rpb2* foram geradas para um subconjunto de isolados, representativos das três linhagens distintas. Dentro da linhagem 1 do FCSC agruparam 61 isolados, juntamente com o tipo de *F. chlamydosporum* CBS 125.45 e outro material de referência. A linhagem 2 foi representada por sete, e a linhagem 3 por 12 isolados. Os isolados representativos de todas as três linhagens produziram níveis detectáveis de nivalenol (NIV) e deoxinivalenol (DON) *in vitro*. Os marcadores morfológicos das espécies, como a ramificação típica dos conidióforos no micélio aéreo, a morfologia dos conídios e a produção abundante de clamidósporos permitem a identificação de isolados como membros do FCSC. As plântulas de arroz inoculadas com isolados de FCSC-1 e FCSC-2 não desenvolveram sintomas de doença nas condições avaliadas, mas a inoculação na inflorescência resultou na colonização de sementes pelo fungo. A taxa de germinação das sementes infectadas foi reduzida em até 27% em comparação com o controle. Este é o primeiro relato da ocorrência de *F. chlamydosporum*, bem como as duas linhagens filogenéticas irmãs, em arroz no Brasil. As espécies do FCSC colonizam as plantas de arroz como endófito e há evidências de que elas também ocorrem em outras gramíneas e culturas pertencentes a outras famílias botânicas. Ainda não está claro se elas podem causar doenças em plantas cultivadas. As espécies do complexo são capazes de produzir tricotecenos do grupo B, entretanto, as condições de produção, a sua regulação genética e a probabilidade real de contribuir para a contaminação do arroz com tricotecenos são questões que ainda devem ser investigadas.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Tricotecenos. Endófito.

GENERAL ABSTRACT

Rice grains sampled along producing regions in Brazil yielded several species of *Fusarium*, including members of the poorly known *Fusarium chlamydosporum* species complex FCSC. The objectives of this study were to characterize isolates of the FCSC using molecular phylogenetics and morphological markers, to evaluate their potential to produce mycotoxins, and to study their strategies of colonization and transmission in rice plants. A brief literature review of the rice crop, the history of the FCSC and the mycotoxins produced by *Fusarium* species is given in the first part of this Thesis, followed by the experimental part, where about 70 isolates of the FCSC were studied. Phylogenetic analyses of partial DNA sequences of *Tef-1 α* gene with 11 reference strains from previous works, including the ex-type strain of *F. chlamydosporum* CBS 145.25, classified the rice-derived isolates into three known phylogenetic lineages in the FCSC. These findings were supported by multilocus phylogenetic analyses using a subset of the isolates and sequences of *Cal* and *Rpb2*. Sixty one isolates were grouped in lineage 1 of the FCSC, together with the strain CBS 145.25. Lineages 2 and 3 contained seven and twelve isolates, respectively. Isolates of all three lineages produced detectable levels of nivalenol (NIV) and deoxynivalenol (DON) *in vitro*. Morphological markers observed for all isolates of the FCSC included the typical ramification of conidiophores in the aerial mycelium, the morphology of conidia and the abundant production of chlamydospores. Rice plantlets inoculated with isolates of FCSC-1 and FCSC-2 did not develop disease symptoms in the evaluated conditions, but inoculation on the inflorescence resulted in colonization of seeds by the isolates. The reduction in germination rates of the colonized seeds reached 27% in comparison with the uninoculated controls. This is the first report of the occurrence of *F. chlamydosporum* as well as the two not yet named phylogenetic sister lineages on rice in Brazil. Isolates of the FCSC colonized rice plants as endophytes, but it is not yet clear if they can cause disease on rice and other cultivated plants. The production of type B trichothecenes by the rice-derived isolates justifies additional investigations on the genetic regulation of mycotoxin production by members of the FCSC and assessments of trichothecene levels in rice grains naturally contaminated by these fungi.

Keywords: *Oryza sativa*. Trichothecenes. Endophyte.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 – Árvore filogenética gerada pela análise de Máxima parcimônia a partir de sequências combinadas dos genes *Tef1- α* e *Rpb2* de isolados de *Fusarium chlamydosporum* obtidos nesse trabalho e isolados de referência. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CML= Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. NRRL= National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, EUA. CBS= Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands43
- Figura 2 – Árvore filogenética gerada pela análise de Máxima parcimônia a partir de sequências combinadas dos genes *Tef1- α* , *Rpb2* e *Cal* de isolados de *Fusarium chlamydosporum* obtidos nesse trabalho e isolados de referência. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CML= Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. NRRL= National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, EUA. CBS= Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands44
- Figura 3 – Morfologia de *Fusarium chlamydosporum*. A-B: Clamidósporos em cadeia; C-D: Coloração em placas de BDA; E: Polifíalides; F: microconídio no micélio aéreo; G: microconídios de 0-1 septos46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 – Isolados de *Fusarium chlamydosporum* utilizados nesse estudo ..32
- Tabela 2 – Isolados de *Fusarium* de referência utilizados nesse estudo35
- Tabela 3 – Incidência em grãos, altura da planta, comprimento de raiz e germinação de sementes de arroz inoculadas com isolados de FCSC.....47
- Tabela 4 – Média de produção de tricotecenos de *Fusarium chlamydosporum* cultivados em meio sintético (BDA) quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência49
- Tabela 5 – Média de produção de deoxinivalenol por complexos de espécies encontrados em amostras de grãos de arroz dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Tocantins, quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência50

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	13
2 ESTADO DA ARTE	15
2.1 A cultura do arroz	15
2.2 <i>Fusarium chlamydosporum</i> Species Complex (FCSC)	16
2.3 Micotoxinas produzidas por espécies de <i>Fusarium</i>	17
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2 <i>Fusarium chlamydosporum</i> associado a arroz: filogenia, <i>lifestyle</i> e potencial toxigênico	25
RESUMO	26
ABSTRACT	28
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Obtenção dos isolados	30
2.2 Análise filogenética.....	36
2.3 Caracterização morfológica	37
2.4 Teste de colonização pela inflorescência	37
2.5 Testes de transmissão	38
2.5.1 Semente para plântula	38
2.5.2 Semente para o grão	39
2.6 Teste de germinação de sementes	39
2.7 Determinação do potencial toxigênico para tricotecenos	40
2.7.1 Análise <i>in vitro</i>	40
3 RESULTADOS.....	40

3.1 Diversidade filogenética de isolados do FCSC	40
3.2 Caracterização morfológica	44
3.3 Testes de colonização e transmissão	45
3.4 Caracterização do potencial toxigênico para tricotecenos	47
4 DISCUSSÃO	50
4.1 Filogenia	50
4.2 Morfologia	50
4.3 Testes de colonização e transmissão	51
4.4 Micotoxinas	52
5 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO	58

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) se destaca entre os cereais de maior importância mundial, sendo predominantemente cultivado para consumo interno nos países produtores, constituindo alimento básico para a nutrição humana. Depois dos países asiáticos o Brasil, está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 12 milhões de toneladas na última safra (CONAB, 2016). Essa produção é oriunda de dois sistemas de cultivo: irrigado e de sequeiro. Apesar do grande volume produzido, o arroz é um produto que é produzido para satisfazer as necessidades domésticas nos países ou regiões do mundo em que é produzido (SOSBAI, 2014).

Muitas espécies de *Fusarium* infectam cereais economicamente importantes, como o milho, trigo, aveia, sorgo, cevada, centeio e arroz (Bottalico, 1998; Astolfi et al., 2011; Sharma et al., 2011; Gomes et al., 2015; Kuhnem et al., 2016). No mundo, mais comumente, são relatadas espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) associadas a arroz com sintomas de bakanae, que incluem podridão da coroa, nanismo ou alongamento anormal do colmo em decorrência da produção de giberelina pelo fungo (Desjardins et al., 2000; Wulf et al., 2010).

Em arroz, *F. chlamydosporum* foi encontrado na Índia, Nigéria, Malásia, Coréia do Sul e Argentina (Savard et al. 1990; Broggi et al., 2001; Makun et al., 2011; Islam & Borthakur 2012; Ok et al., 2014). No Brasil, isolados com morfologia típica de *F. chlamydosporum* foram encontrados em associação com arroz (Gomes, 2014). Esse fungo foi encontrado também associado à cultura do milho (Rabie et al., 1978).

A descrição original de *Fusarium chlamydosporum* data de 1925, relatando sua ocorrência em associação com pseudocaule de bananeira e solo em Honduras na América Central (Wollenweber & Reinking, 1925). O termo "*Fusarium chlamydosporum species complex*" (FCSC) foi introduzido por O'Donnell et al. (2009), quando quatro linhagens filogenéticas distintas foram diferenciadas por análise multigênica.

Espécies de *Fusarium* associadas a grãos de arroz são reconhecidas produtoras de micotoxinas como fumonisinas produzida por espécies do complexo *F. fujikuroi*, zearalenona e tricotecenos, tais como a deoxinivalenol e a nivalenol

produzidas por espécies dos complexos *F. graminearum*, *Fusarium incarnatum-equiseti* e *F. chlamydosporum* (Desjardins, 2006; O'Donnell et al., 2013).

No Brasil, em consonância com normativas internacionais visando à segurança alimentar e com base na frequência com que micotoxinas têm sido encontradas em grãos e alimentos, foi estabelecida uma legislação para limites máximos tolerados para diversas micotoxinas em grãos de cereais, incluindo o arroz e seus subprodutos (ANVISA, 2011).

Para o arroz, foram regulamentados limites máximos para as micotoxinas deoxinivalenol e zearalenona no ano de 2011, ambas produzidas por espécies de *Fusarium*, especialmente as do complexo de espécies *Fusarium graminearum*, que têm sido as mais estudadas quanto à produção de tricotecenos. Espécies do complexo de espécies *Fusarium graminearum* já foram relatadas em arroz no Sul do Brasil, sendo a espécie predominante *F. asiaticum* (Gomes et al., 2015).

Existem evidências de que *Fusarium chlamydosporum* seja produtor de tricotecenos. Em um estudo sobre os genes responsáveis pela biossíntese dos tricotecenos, um isolado de *F. chlamydosporum* foi identificado como produtor desse grupo de micotoxinas (Moretti et al., 2013). E em outro estudo envolvendo filogenia molecular, FCSC foi agrupado com outros complexos conhecidos como produtores de tricotecenos (O'Donnell et al., 2013).

O complexo FCSC é ainda pouco estudado e a real diversidade de espécies desse complexo assim como seus substratos, capacidade de produção de micotoxinas e distribuição geográfica continuam desconhecidos. No Brasil, *Fusarium chlamydosporum* foi isolado das raízes e inflorescência de Nogueira (*Carya illinoensis*), no entanto a identificação não foi feita a nível de complexo (Lazarotto et al., 2013). O presente trabalho é pioneiro na identificação de espécies do FCSC associados a arroz no Brasil, bem como a capacidade desses representantes em produzir tricotecenos.

As hipóteses desse trabalho são que as linhagens do FCSC não são patogênicas a arroz, existem diversas linhagens do FCSC associadas a arroz no Brasil, a contaminação do arroz por tricotecenos ocorra por espécies do FCSC e as linhagens desse complexo variam entre as regiões produtoras. Portanto, propomos relatar e caracterizar espécies do FCSC associados a grãos de arroz obtidas de diferentes regiões do país por meio do uso de filogenia molecular, caracterização

morfológica, além de verificar o potencial dessas espécies em produzir as micotoxinas do grupo dos tricotecenos e investigar as vias de colonização e transmissão.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 A cultura do arroz

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como o principal alimento de mais da metade da população mundial. O arroz é cultivado em todos os continentes, destacando em primeiro lugar o asiático, com uma produção equivalente a 90% da mundial (FAOSTAT, 2015). Na Ásia, estão os oito maiores produtores mundiais de arroz. Em 1º lugar está a China, seguida pela Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnam, Tailândia, Myanmar e Filipinas, que produzem 203, 159, 71, 52, 44, 39, 28 e 18 milhões de toneladas, respectivamente. A China contribui com uma produção equivalente a 27% da mundial e 30% da asiática, seguida pela Índia com 21% e 24%, respectivamente.

O Brasil situa-se em 9º lugar, com uma produção correspondente a 1,6% da mundial (FAOSTAT, 2015). O arroz constitui-se num dos componentes da dieta da população brasileira. Assume importância relevante nas ações sociais e governamentais de incentivo ao seu cultivo para assegurar os níveis de oferta e consumo, especialmente das classes mais carentes da população, que normalmente têm no arroz um alimento essencial em sua dieta (Katsurayama et al., 2017). Atualmente, no Brasil, o arroz ocupa o terceiro lugar em área cultivada com culturas anuais (CONAB, 2016). É um cereal produzido em todo o país, representando a principal fonte de renda agrícola de alguns estados como o Rio Grande do Sul e Goiás (EMBRAPA, 2006). No Brasil, essa cultura é produzida sob dois sistemas de cultivo. O cultivo de sequeiro, também chamado de “cultivo em terras altas”, e o cultivo de arroz irrigado. O cultivo em terras altas adota o plantio logo após o início das chuvas. Os principais fatores climáticos que influenciam a cultura do arroz são a temperatura, o fotoperíodo e a precipitação pluvial. A temperatura influencia na fisiologia da planta, prejudicando seu crescimento, desenvolvimento e a produtividade conforme a fase fonológica. As faixas de temperaturas ideais variam de 20 a 35°C, sendo de 30 a 33°C para fase de floração e de 20 a 25°C para maturação. A produção de arroz em regime de sequeiro depende do regime pluvial, sendo mais prejudicial no estágio de florescimento e enchimento de grãos, que podem comprometer a produtividade.

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

Fusarium causa doenças em um grande número de plantas incluindo os cultivos cereais de maior importância para a alimentação humana e animal como o milho, trigo, arroz (Leslie & Summerell, 2006). No arroz, o mal do colo é uma doença causada por *Fusarium oxysporum*, causando sintomas na parte aérea da planta que caracterizam-se por leve amarelecimento das folhas e retardando o crescimento, estes sintomas são mais evidentes aos 25 dias após o plantio (EMBRAPA, 2006).

Espécies do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* são constantemente encontradas, causando uma doença conhecida como bakanae cujos sintomas incluem podridão da coroa, nanismo, bem como o estiolamento e alongamento anormal induzido pela produção de giberelina (Desjardins et al., 2000). A grande preocupação é que espécies desse gênero sob condições ambientais favoráveis, podem infectar pela inflorescência ou por sementes contaminadas causando diversos danos, além de contribuírem também para a contaminação com micotoxinas.

2.2 *Fusarium chlamydosporum* Species Complex (FCSC)

O termo “forma specialis” refere-se a um grupo de espécies estreitamente relacionadas, essa relação antigamente era associada somente a patogenicidade a determinadas plantas, com o advento da filogenia molecular foi evidenciado que uma espécie englobava várias espécies filogenéticas distintas (O’Donnell et al., 2000). Dessa forma vários complexos foram criados para agrupar as espécies de *Fusarium*: *Fusarium solani* species complex (FSSC), *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC), *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) (O’Donnell et al., 2000; O’Donnell et al., 2009).

O termo “*Fusarium chlamydosporum* species complex” (FCSC) foi introduzido por O’Donnell et al. (2009) que analisaram uma coleção de 26 isolados obtidos de

humanos e animais e diferenciaram quatro linhagens filogenéticas distintas, baseado em análises das regiões gênicas *Tef1- α* (Translation Elongation Factor 1- α), *RPB2* (RNA Polimerase II gene), *LSU* (Large Subunit Ribosomal) *rDNA* (DNA Ribosomal) e *CAL* (Calmodulina).

Isolados do FCSC se caracterizam pelo crescimento rápido em BDA, micélio aéreo abundante e ramificado, de coloração esbranquiçada a roseado ou amarronzado, microconídios e clamidósporos em abundância (Nelson et al., 1983; O'Donnell et al., 2009). Embora a descrição original dessa espécie tenha sido em banana, em diversas outras culturas ele já foi encontrado, como em arroz, milho, sorgo, milheto e lentilha (Marasas et al., 1984; Savard et al., 1990; Lincy et al., 2011). Essa espécie pode ser encontrada em associação com diversas plantas. No entanto pouco se sabe sobre seu estilo de vida e como ocorre a sua transmissão (Elmer et al., 2001; Palmero et al., 2009).

Fusarium chlamydosporum pode ser considerado um saprófita, embora já tenha sido verificada patogenicidade moderada em testes de infecção em mudas de ervilha (Seemüller, 1968 apud Gerlach & Nirenberg, 1982). Nahar e Mushtaq (2006) testaram a patogenicidade de seis espécies de *Fusarium* isoladas de sementes de girassol, infestadas naturalmente, e evidenciaram a patogenicidade de *F. chlamydosporum* a mudas da cultura, sendo essa espécie especificamente responsável pelo sintoma de murcha e podridão do colo.

Esse fungo já foi isolado como endófito de raízes sadias de Orquídeas (*Dendrobium crumenatum*) na Malásia. Mathivanan e Murugegesan (2000) isolaram *F. chlamydosporum* de pústulas de ferrugem do amendoim (*Puccinia arachidis*) e o testaram como agente de biocontrole em experimentos *in vitro* e *ex vitro*, concluindo que a aplicação de esporos do fungo sobre as pústulas da ferrugem reduziram a infecção em uma faixa de 4 a 48%.

2.3 Micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium*

Fungos filamentosos são capazes de produzir uma ampla gama de compostos químicos denominados metabólitos secundários (Stadler & Keller, 2008), ou seja, produtos naturais de baixo peso molecular, sem função clara ou específica nas suas espécies produtoras (Keller et al., 2005). Quando possuem uma atividade citotóxica, tais metabólitos são denominados micotoxinas (Desjardins et al., 1993). O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas dependem de uma complexa

interação de diversos fatores, como atividade de água, temperatura, oxigênio e substrato (Heidtmann-Bemvenuti et al., 2012). As micotoxinas mais conhecidas produzidas por *Fusarium* spp. incluem representantes das classes dos tricotecenos e zearalenona, ambos produzidos por *F. graminearum*, além das fumonisinas que é produzida por *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum* (Reid et al., 1999). As quais são relacionadas com casos de micotoxicoses que acometem humanos e animais ao redor do mundo, geralmente em virtude da crescente contaminação de cereais (Bryden et al., 2001; Bryden, 2007).

Devido às dificuldades associadas ao manejo em pré-colheita em reduzir a concentração de micotoxinas nos grãos, muitos países promulgaram limites máximos toleráveis (LMT's) de concentração de micotoxinas em grãos e subprodutos (McMullen et al., 2012; Gilbert & Haber, 2013). No Brasil entrou em vigor no ano de 2011 uma resolução que estabelece LMT para diversos tipos de grão e sub produtos (Anvisa, Resolução - RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011). O LMT para arroz e subprodutos varia, diminuindo os limites para DON, chegando a 1000 µg/kg no ano de 2016. Até o momento não há legislação prevendo LMT para NIV, em alimentos ou rações, incluindo o arroz no Brasil (Sugita-Konishi & Nakajima, 2009). Os tricotecenos constituem um grupo de mais de 100 micotoxinas e possuem esse nome devido a sua estrutura química, composta de um anel com esqueleto tetracíclico. Essas toxinas são classificadas em tipo A, no qual se encontram as toxinas T-2, HT-2, 15-monoacetoxiscirpenol (15-MAS) e diacetoxiscirpenol (DAS), e em tipo B, no qual está o nivalenol (NIV), desoxinivalenol (DON) e suas formas acetiladas, 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON) (Santin et al., 2001). Tricotecenos, são comumente detectados em grãos como trigo, cevada, aveia ou milho (Desjardins et al., 1993; Goswami & Kistler, 2005). Estão fortemente relacionados às toxicoses crônicas e fatais em humanos e animais devido aos seus efeitos imunossupressivos e inibidores da síntese protéica em eucariotos (Bryden, 2007). Evidências históricas associam surtos de toxicoses no Japão relacionadas ao consumo de grãos contaminados por *F. graminearum* em 1900 e também após 1945, o caso conhecido como akakabi-byo. Os sintomas clínicos desta toxicose incluem náusea, vômito, diarreia, tontura e alucinações (Desjardins et al., 1993). Existe muitas variações sobre o perfil toxigênico das espécies de *Fusarium*, entretanto não existe nenhuma relação dessas micotoxinas com a patogenicidade (Leslie & Summerell, 2006). No Brasil, em amostras provenientes do estado do Rio Grande do Sul, a

ocorrência de Deoxinivalenol (DON) e Zearalenona (ZEA) foi relatada em arroz do tipo parboilizado, (Dors et al., 2011) e em frações de arroz com casca (endosperma, casca e farelo) e parboilizado (Heidtmann-Bemvenuti et al., 2012). Uma das hipóteses, é que as condições climáticas no Brasil são, de maneira geral, favoráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos (Furlong et al., 1995; Backhouse et al., 2014). Estes fungos podem contaminar as amostras no campo e serem substituídas por outros gêneros mais adaptados às condições de armazenamento, porém a micotoxina pode permanecer (Pitt et al., 1997; Samson et al., 1981).

São poucos os trabalhos sobre as micotoxinas produzidas por *Fusarium chlamydosporum*, existem apenas duas evidências (Moretti et al., 2013; O'Donnell et al., 2013). Um estudo sobre a identificação dos genes do cluster *TRI* responsáveis pela biossíntese da produção de tricotecenos relata que *F. chlamydosporum* é produtor desse grupo de micotoxinas (Moretti et al., 2013). Em um estudo filogenético feito por O'Donnell et al (2013) FCSC agrupa com demais complexos já identificados como produtores de tricotecenos. Diante do exposto, percebe-se a necessidade de investigar a produção de micotoxinas a partir de isolados desse complexo, uma vez que a presença dessas interferem na cadeia produtiva afetando a saúde humana e a animal.

REFERÊNCIAS

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2011). Resolução RDC 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.
- Astolfi P, dos Santos J, Schneider L, Gomes LB, Silva CN, Tessmann DJ, Del Ponte EM (2011). Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in southern Brazil. *International Journal Food Microbiology* 148:197-201.
- Backhouse D (2014). Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. *European Journal of Plant Pathology* 139:161–73.
- Bottalico A (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80:85-103.
- Bryden WL, Logrieco A, Abbas HK, Porter JK, Vesonder RF, Richard JL, Cole RJ (2001). Other significant *Fusarium* mycotoxins. In: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW (Eds.) *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St Paul, Minnesota. p. 360-92.
- Broggi LE, Moltó GA (2001). Fungi associated with rice at entre rios province, Argentina. toxigenic capacity of *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale* isolates. *Mycotoxin Research* 17:96-107.
- Bryden WL (2007). Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16 Suppl 1:95-101.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamentos de safra. Acomp. safra bras. grãos, v. 1 – Safra 2015/16, n. 5. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_11_15_22_20_boletim_graos_fevereiro_2014.pdf]. Acesso em: 10 julho. 2017.
- Desjardins A, Hohn TM, McCormick SP (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiological Reviews* 57:595-604.
- Desjardins AE, Manandhar HK, Plattner RD, Manandhar GG, Poling SM, Maragos CM (2000). *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1020-1025.
- Desjardins AE (2006). *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society, St. Paul MN. 230p
- Dors GC, Bierhals VS, Furlong EB (2011). Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. *Arroz parboilizado: composição química e ocorrência de micotoxinas. Ciência e Tecnologia de Alimentos* 31:172-177.

Elmer WH (2001). *Fusarium* diseases of asparagus. In: Summerell BA et al. (eds.) *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. American Phytopathological Society, St. Paul MN. pp.248-262.

EMBRAPA (2006). Editores técnicos: Santos AB, Stone LF, Vieira NRA. A cultura do arroz no Brasil. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás GO. 358p.

FAOSTAT Online Database (2015) <http://faostat.fao.org/>

Farias CR, Afonso AP, Brandão M, Pierobom C (2007). Incidência de fungos associados a sementes de arroz em seis regiões produtoras do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência* 13:487-490.

Franco DF, Ribeiro A, Nunes C, Ferreiro E (2001). Fungos associados a sementes de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência* 7:235-236.

Furlong EB, Soares LMV, Lasca CC, Kohara EY (1995). Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 131:185-190.

Gerlach W, Nirenberg H (1982). The genus *Fusarium*: a pictorial atlas (Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem). Berlin: Kommissionsverlag P Parey 209:1-406

Gilbert J, Haber S (2013). Overview of some recent research developments in *Fusarium* head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 35:149-174.

Gomes LB (2014). Diversidade, potencial toxigênico e patogenicidade de espécies de *Fusarium* em sementes de arroz. Dissertação de Mestrado. UFRGS Porto Alegre RS.

Gomes LB, Ward TJ, Badiale-Furlong E, Del Ponte EM (2015). Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. *Plant Pathology* 64:980-987.

Goswami RS, Kistler HC (2005). Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* 95:1397-1404.

Heidtmann-Bemvenuti R, dos Santos Hackbart HC, de Souza MM, Badiale-Furlong E, Dors GC, Fagundes CA (2012). Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. *Quimica Nova* 35:1244–1249.

Islam NF, Borthakur SK (2012). Screening of mycota associated with Aijung rice seed and their effects on seed germination and seedling vigour. *Plant Pathology Quarantine* 2:75-85.

Katsurayama AM, Taniwaki M H (2017). Fungi and aflatoxins in rice: occurrence and significance to consumer health. *Brazilian Journal of Food Technology* 20:2-13.

- Keller NP, Turner G, Bennett JW (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature reviews. Microbiology* 3:937-47.
- Kuhnem PR, Ward TJ, Silva CN, Spolti P, Ciliato ML, Tessmann DJ, Del Ponte EM (2016). Composition and toxigenic potential of the *Fusarium graminearum* species complex from maize ears, stalks and stubble in Brazil. *Plant Pathology* 65:185-1191.
- Lee FN, Rush MC (1983). Rice sheath blight: a major rice disease. *Plant Disease* 67:829-832.
- Leslie JF, Summerell BA (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishers, Ames IA.
- Lincy SV, Chandrashekar A, Narayan MS, Sharma R, Thakur RP (2011). Natural occurrence of trichothecene-producing *Fusaria* isolated from India with particular reference to sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:981-989.
- Makun HA, Dutton M, Njobeh PB, Phoku JZ, Yah CS (2011). Incidence, phylogeny and mycotoxigenic potentials of fungi isolated from rice in Niger State, Nigeria. *Journal of Food Safety* 31:334-349.
- Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA (1984). *Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology*. Pennsylvania State University.
- Mathivanan N, Murugesan K (2000). *Fusarium chlamydosporum*, a potent biocontrol agent to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 107:225-234.
- McMullen M, Bergstrom G, De Wolf E, Dill-Macky R, Hershman D, Shaner G, Van Sanford D (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Disease* 96:1712-1728.
- Moretti A, Susca A, Mulé G, Logrieco AF, Proctor RH (2013). Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *International Journal of Food Microbiology* 167:57-66.
- Nahar S, Mustaq M (2006). Pathogenicity and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species (sec *Liseola* and *Sporotrichiella*) in sunflower. *Pakistan Journal of Botany* 38:487-492.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983). *Fusarium Species: An Illustrated Manual for identification*, Pennsylvania State University. University Park.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik EA (2000). Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.

- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM (2009). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 47:3851-3861.
- Ok HE, Kim DM, Kim D, Chung SH, Chung MS, Park KH, Chun HS (2014). Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control* 37:284-291.
- Ou SH (1985). Rice diseases. Kew, United Kingdom: Commonwealth Mycological Institute 1:1-371.
- Palmero D, Iglesias C, de Cara M, Lomas T, Santos M, Tello JC (2009). Species of *Fusarium* isolated from river and sea water of southeastern Spain and pathogenicity on four plant species. *Plant Disease* 93:377-385.
- Pitt JI, Hocking AD (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Rabie CJ, Lubben A, Louw EB, Rathbone EB, Steyn PS, Vleggaar R (1978). Moniliformin, a mycotoxin from *Fusarium fusarioides*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 26:375-379.
- Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Schaafsma AW (1999). Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* 89: 028-1037.
- Samson RA, Hoekstra ES, Van Oorschot CA (1981). Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Santin E, Maiorka A, Zanella I, Magon L (2001). Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. *Ciência Rural* 31:185-190.
- Savard ME, Miller JD, Salleh B, Strange RN (1990). Chlamydosporol, a new metabolite from *Fusarium chlamydosporum*. *Mycopathologia* 110:177-181.
- Sharma R, Thakur RP, Senthilvel S, Nayak S, Reddy V, Rao VP, Varshney RK (2011). Identification and Characterization of Toxigenic Fusaria Associated with sorghum grain mold complex in India. *Mycopathologia* 171:223-230.
- SOSBAI (2014). Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 6. Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Bento Gonçalves, RS, Brasil. 192p.
- Stadler M, Keller NP (2008). Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological Research* 112:127-130.

Sugita-Konishi Y, Nakajima T (2009). Nivalenol: the mycology, occurrence, toxicology, analysis and regulation. In: Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons. Springer Berlin Heidelberg, 2009. 273p.

Wollenweber HW, Reinking OA (1925). Aliquot *Fusaria Tropicalia Nova Vel Revisa*. *Phytopathology* 15:155-169.

Wulff EG, Sorensen JL, Lübeck KFN, Thrane U, Torp J (2010). *Fusarium* spp. associated with Rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology* 12:649-657.

CAPÍTULO 2 - Artigo

Fusarium chlamydosporum associado a arroz: filogenia, *lifestyle* e potencial toxigênico

RESUMO

Entre várias espécies do gênero *Fusarium*, que ocorrem em associação com o arroz, os representantes do complexo de espécies de *Fusarium chlamydosporum* FCSC foram obtidos a partir de amostras de grãos de arroz, coletados em diferentes áreas de produção no Brasil. O objetivo deste estudo foi caracterizar cerca de 70 isolados do FCSC, obtidos a partir de grãos de arroz e outros substratos por meio de análises filogenéticas de seqüências parciais dos genes *Tef-1 α* , *Rpb2* e *Cal*, marcadores morfológicos, produção *in vitro* de tricotecenos, nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) e suas formas acetiladas 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON) e estudar estratégias de colonização e transmissão do fungo em plantas de arroz. Para comparação, 11 isolados de referência foram consideradas nas análises filogenéticas, incluindo o tipo CBS 145.25 obtido de bananeira em Honduras em 1925. As análises das seqüências de *Tef-1 α* evidenciaram que os isolados pertencem a três das linhagens filogenéticas conhecidas do FCSC. As seqüências das regiões *Cal* e *Rpb2* foram geradas para um subconjunto de isolados, representativos das três linhagens distintas. Dentro da linhagem 1 do FCSC agruparam 61 isolados, juntamente com material de referência e o tipo de *F. chlamydosporum* CBS 125.45. A linhagem 2 foi representada por sete e a linhagem 3 por 12 isolados. Os isolados representativos de todas as três linhagens produziram níveis detectáveis de nivalenol (NIV) e deoxinivalenol (DON) *in vitro*. Os marcadores morfológicos das espécies, como a ramificação típica dos conidióforos no micélio aéreo, a morfologia dos conídios e a produção abundante de clamidósporos permitem a identificação de isolados como membros do FCSC. As plântulas de arroz inoculadas com isolados de FCSC-1 e FCSC-2 não desenvolveram sintomas de doença nas condições avaliadas, mas a inoculação na inflorescência resultou na colonização de sementes pelo fungo. A taxa de germinação das sementes infectadas foi reduzida em até 27% em comparação com o controle. Este é o primeiro relato da ocorrência de *F. chlamydosporum*, bem como as duas linhagens filogenéticas irmãs ainda não descritas sobre o arroz no Brasil. As espécies do FCSC colonizam as plantas de arroz como endófito e há evidências de que elas também ocorrem em outras gramíneas e culturas pertencentes a outras famílias botânicas. Ainda não está claro se elas podem causar doenças em plantas cultivadas. As espécies do complexo são capazes de produzir tricotecenos do grupo B, mas as condições para a produção, sua regulação genética e a probabilidade real de contribuir para a contaminação do arroz com tricotecenos ainda devem ser investigadas.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Tricotecenos. Endófito.

ABSTRACT

Rice grains sampled along producing regions in Brazil yielded several species of *Fusarium*, including members of the poorly known *Fusarium chlamydosporum* species complex FCSC. The objectives of this study were to characterize about 70 isolates of the FCSC obtained from rice grains and a few other substrates using molecular phylogenetics and morphological markers, to evaluate their potential to produce mycotoxins, and to study their strategies of colonization and transmission in rice plants. Phylogenetic analyses of partial DNA sequences of *Tef-1 α* gene with 11 reference strains from previous works, including the ex-type strain of *F. chlamydosporum* CBS 145.25, classified the rice-derived isolates into three known phylogenetic lineages in the FCSC. These findings were supported by multilocus phylogenetic analyses using a subset of the isolates and sequences of *Cal* and *Rpb2*. Sixty one isolates were grouped in lineage 1 of the FCSC, together with the strain CBS 145.25. Lineages 2 and 3 contained seven and twelve isolates, respectively. Isolates of all three lineages produced detectable levels of nivalenol (NIV) and deoxynivalenol (DON) *in vitro*. Morphological markers observed for all isolates of the FCSC included the typical ramification of conidiophores in the aerial mycelium, the morphology of conidia and the abundant production of chlamydospores. Rice plantlets inoculated with isolates of FCSC-1 and FCSC-2 did not develop disease symptoms in the evaluated conditions, but inoculation on the inflorescence resulted in colonization of seeds by the isolates. The reduction in germination rates of the colonized seeds reached 27% in comparison with the uninoculated controls. This is the first report of the occurrence of *F. chlamydosporum* as well as the two not yet named phylogenetic sister lineages on rice in Brazil. Isolates of the FCSC colonized rice plants as endophytes, but it is not yet clear if they can cause disease on rice and other cultivated plants. The production of type B trichothecenes by the rice-derived isolates justifies additional investigations on the genetic regulation of mycotoxin production by members of the FCSC and assessments of trichothecene levels in rice grains naturally contaminated by these fungi.

Keywords: *Oryza sativa*. Endophyte. Trichothecenes.

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) destaca-se como o cereal de maior importância mundial, sendo predominantemente cultivado para consumo interno nos países produtores, constituindo alimento básico para a nutrição humana (Katsurayama et al., 2017). Atualmente, o Brasil encontra-se entre os dez principais produtores mundiais de arroz e contabilizou na safra de 2016 cerca de 12 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016).

Em arroz, o complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) predomina e abriga os agentes causais da Bakanae em arroz (Carter et al., 2008). Entretanto, outros complexos também estão presentes nessa cultura, como o complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC), complexo de espécies *Fusarium incarnatum equiseti* (FIESC) (Amatulli et al., 2012; Ok et al., 2014; Gomes et al., 2015). No Brasil, isolados com morfologia típica de *F. chlamydosporum* foram encontrados em associação com arroz.

A descrição original de *F. chlamydosporum* data de 1925, quando foi relatado sua ocorrência em associação com pseudocaule de bananeira e solo em Honduras na América Central (Wollenweber & Reinking 1925). O termo "*Fusarium chlamydosporum species complex*" (FCSC) foi introduzido por O'Donnell et al. (2009) que, ao analisar uma coleção de isolados obtidos de humanos e animais, diferenciou quatro linhagens filogenéticas distintas, baseado em análises das regiões gênicas *Tef1- α* , *RPB2*, *LSU rDNA* e *Cal*.

Isolados do FCSC se caracterizam pelo crescimento rápido em BDA, micélio aéreo abundante e ramificado, de coloração esbranquiçada a roseado ou amarronzado, microconídios clavados e clamidósporos em abundância (Nelson et al., 1983; Leslie and Summerell, 2006). Em arroz, *F. chlamydosporum* foi relatado em países asiáticos (Savard et al., 1990; Makun et al., 2011; Islam & Borthakur 2012) e na Argentina (Broggi et al., 2001). A espécie produz supostamente as micotoxinas moniliformina, ácido fusárico e clamidosporal. Existem evidências filogenéticas e genotípicas que *Fusarium chlamydosporum* seja produtor de tricotecenos (Moretti et al., 2013; O'Donnell et al. 2013;).

O complexo FCSC ainda é pouco estudado e a diversidade de espécies assim como seus substratos e distribuição geográfica continuam desconhecidos. O presente trabalho propôs o estudo filogenético, avaliação do potencial toxigênico e investigar

as estratégias de colonização e transmissão a partir de uma coleção de isolados de FCSC obtidos de grãos de arroz de diferentes regiões produtoras do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados nesse trabalho 72 isolados do complexo de espécies *Fusarium chlamydosporum* obtidos de grãos de arroz, milho, panicum, abóbora e solo de cultivo de soja (Tabela 1). Também foram incluídos isolados obtidos da CML (Coleção Micológica de Lavras), BBA (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Mikrobiologie, Berlin, Germany), CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) e KSU (Kansas State University), totalizando mais 11 isolados.

Amostras de arroz (grãos) foram obtidas dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás, Roraima, São Paulo e Tocantins nos anos de 2009, 2010, 2012 e 2015 e 2016. Também foram obtidas duas amostras de milho do estado de Roraima. Todas as amostras foram submetidas ao método de detecção por *Blotter Test* (Agarwal et al., 1989). Foram desinfetadas superficialmente 200 sementes (álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%) e dispostas em recipientes (10 x 10 cm) plásticos (50 grãos por recipiente) sobre três folhas de papel filtro, umedecidos com solução salina 1%. Os recipientes foram mantidos em uma câmara incubadora à temperatura de 23±2 °C e fotoperíodo de 12 horas por um período de doze dias (Agarwal et al., 1989). As sementes foram analisadas visualmente com o auxílio de um microscópio estereoscópio e as colônias típicas de *Fusarium* foram transferidas para placas contendo meio de cultura BDA.

Para obtenção de culturas monospóricas, plugs da cultura fúngica em SNA foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de água destilada e esterilizada e agitada em vórtex. Uma pequena alíquota foi transferida para meio ágar-água e espalhada com uma alça de Drigalski. Após 24 h um microconídio com a presença do tubo germinativo, foi transferido para meio BDA, seguido de incubação em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h por sete dias.

Tabela 1. Isolados de *Fusarium chlamyosporum* utilizados nesse estudo

Código	Espécie / linhagem	Hospedeiro / Substrato	Origem / estado	Isol.	Tef1a	Rpb2	Cal
CML 3609	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2009	x	x	x
CML 3610	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2009	x	x	x
CML 3612	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2010	x	x	x
CML 3613	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Dom Pedrito RS	2012	x	x	x
CML 3614	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2012	x	x	x
CML 3615	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Agudo RS	2012	x	x	x
CML 3616	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Sto. Antônio de Goiás GO	2012	x	x	x
CML 3617	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2012	x	x	x
CML 3618	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Capivarí do Sul RS	2012	x	x	x
CML 3619	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Capivarí do Sul RS	2012	x	x	x
CML 3620	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2009	x	-	-
CML 3621	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Itajaí SC	2009	x	-	-
CML 3622	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Pelotas RS	2009	x	-	-
CML 3623	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Pelotas RS	2009	x	-	-
CML 3624	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2009	x	-	-
CML 3625	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2009	x	-	-
CML 3626	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2009	x	-	-
CML 3627	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Cachoeirinha RS	2009	x	-	-
CML 3628	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Palmares do Sul RS	2009	x	-	-
CML 3629	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Uruguaiana RS	2012	x	-	-
CML 3630	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Rio Pardo RS	2012	x	-	-
CML 3631	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2012	x	-	-
CML 3632	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Sto Antônio de Goiás GO	2012	x	-	-
CML 3633	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Guaíba RS	2012	x	-	-
CML 3703	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3704	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3705	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-

Continua

Código	Espécie / linhagem	Hospedeiro / Substrato	Origem / estado	Isol.	Tef1a	Rpb2	Cal
CML 3706	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3707	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3708	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3709	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3710	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3711	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3712	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3713	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3714	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3715	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3716	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3717	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3718	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	-	-
CML 3719	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Itajaí SC	2016	x	-	-
CML 3720	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Nova Veneza SC	2016	x	-	-
CML 3721	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Nova Veneza SC	2016	x	-	-
CML 3722	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Lagoa da Confusão TO	2016	x	-	-
CML 3723	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Lagoa da Confusão TO	2016	x	-	-
CML 3724	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Lagoa da Confusão TO	2016	x	-	-
CML 3728	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Santa Maria RS	2016	x	-	-
CML 3729	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Sinop MT	2016	x	-	-
CML 3730	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Roseira SP	2016	x	-	-
CML 3760	FCSC 1	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	-	-
CML 3667	FCSC 1	<i>Panicum maximum</i> (grão)	Porto Alegre RS	2016	x	x	x
CML 3740	FCSC 1	Solo de cultivo de soja	Sinop MT	2014	x	-	-
CML 3611	FCSC 2	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Palmares do Sul RS	2009	x	x	x
CML 3671	FCSC 2	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Brazabrantés GO	2015	x	x	x
CML 3672	FCSC 2	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Lagoa da Confusão TO	2016	x	x	x
CML 3725	FCSC 2	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Lagoa da Confusão TO	2016	x	-	-
CML 3726	FCSC 2	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Glorinha RS	2016	x	-	-
CML 3727	FCSC 2	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Glorinha RS	2016	x	-	-
CML 3731	FCSC 2	<i>Cucurbita</i> sp. (fruto)	Nepomuceno MG	2016	x	x	x

Continua

Códigos	Espécie / linhagem	Hospedeiro / Substrato	Origem / estado	Isol.	Tef1 α	Rpb2	Cal
CML 3673	FCSC 3	<i>Pennisetum americanum</i> (grão)	Alto Alegre RR	2016	x	x	x
CML 3674	FCSC 3	<i>Pennisetum americanum</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	x	x
CML 3752	FCSC 3	<i>Pennisetum americanum</i> (grão)	Alto Alegre RR	2016	x	-	-
CML 3753	FCSC 3	<i>Pennisetum americanum</i> (grão)	Alto Alegre RR	2016	x	-	-
CML 3754	FCSC 3	<i>Pennisetum americanum</i> (grão)	Alto Alegre RR	2016	x	-	-
CML 3755	FCSC 3	<i>Pennisetum americanum</i> (grão)	Alto Alegre RR	2016	x	-	-
CML 3756	FCSC 3	<i>Pennisetum americanum</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	-	-
CML 3757	FCSC 3	<i>Pennisetum americanum</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	-	-
CML 3758	FCSC 3	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	-	-
CML 3759	FCSC 3	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	-	-
CML 3761	FCSC 3	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	-	-
CML 3762	FCSC 3	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	-	-
CML 3763	FCSC 3	<i>Oryza sativa</i> (grão)	Boa Vista RR	2016	x	-	-

Nota: Abreviações das coleções de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; FCSC-1 = *Fusarium chlamydosporum* species complex - clado 1; FCSC-2 = *Fusarium chlamydosporum* species complex - clado 2; FCSC-3 = *Fusarium chlamydosporum* species complex - clado 3; FCSC-4 = *Fusarium chlamydosporum* species complex - clado 4 (*F. nelsonii*); (x) = isolado sequenciado; (-) = isolado não sequenciado.

Tabela 2. Isolados de *Fusarium* de referência utilizados nesse estudo

Códigos	Espécie / linhagem	Hospedeiro / Substrato	Origem / estado	Isol.	<i>Tef1a</i>	<i>Rpb2</i>	<i>Cal</i>
CML 1974 KSU 11569, MRC 3280	FCSC 1	--	--	--	x	x	x
CML 1986 KSU 11568, MRC 1798, CBS 119.844, BBA 62170	FCSC 1	Base caule de Tomate	--	1969	x	x	x
CML 3764 KSU 11396, MRC 8391, CBS 119.843, FRC 11782	FCSC 1	--	--	--	x	-	-
CML 3765 KSU 11398, FRC 12127	FCSC 1	--	--	--	x	-	-
CML 801 KSU 11397, FRC 13125	FCSC 1	--	--	--	x	x	x
CML 3031	FCSC 1	Pimenta	-	2012	x	-	-
CML 3732 BBA 63156	FCSC 2	--	--	--	x	-	-
CML 3734 T CBS 145.25	FCSC 1	Pseudocaule de bananeira	Honduras	1925	x	x	x
CML 3735 CBS 220.61, ATCC 14167, NRRL 20842	FCSC 2	Solo	África do Sul	1955	x	-	-
CML1985 T KSU 564, MRC 4570, CBS 119.876, FRC R8670, NRRL 28505	<i>F. nelsonii</i>	Solo	África do Sul	1986	GQ505404	GQ505468	GQ505374
CML 1971 KSU 565, MRC 4722	<i>F. nelsonii</i>	--	--	--	x	-	-
NRRL 13338, FRC 2181	<i>F. nelsonii</i>	Solo	Austrália	--	GQ505402	GQ505466	GQ505372
NRRL 43631, UTHSC 052441	FCSC 3	Humano	Florida EUA	--	GQ505427	GQ505491	-
NRRL 34013, UTHSC 012416	FCSC 2	Humano	Pennsylvania EUA	--	GQ505408	GQ505472	GQ505378

Continua

Códigos	Espécie / linhagem	Hospedeiro / Substrato	Origem/estado	Isol.	Tef1a	Rpb2	Cal
NRRL 36539, CBS 677.77	FCSC 1	Solo	Ilhas Salomão	--	GQ505422	GQ505486	GQ505391
NRRL 28578, CBS 615.87	FCSC 1	<i>Colocasia esculenta</i>	Cuba	--	GQ505405	GQ505469	GQ505375
RBG 5743	<i>F. aywerte</i>	--	--	--	KP083250	KP083278	-
NRRL 13459	<i>F. concolor</i>	--	--	--	GQ505674	JX171569	GQ505585
NRRL 45999	<i>F. flocciferum</i>	--	--	--	GQ505433	GQ505497	GQ505401
NRRL 34036	<i>Fusarium</i> sp. 1 (FTCS)	--	--	--	GQ505419	GQ505483	-
NRRL 45994	<i>Fusarium</i> sp. 2 (FTCS)	--	--	--	GQ505432	GQ505496	GQ505400
NRRL 34033	<i>F. brachygibbosum</i>	--	--	--	GQ505418	GQ505482	GQ505388
NRRL 43641	<i>F. armeniacum</i>	--	--	--	GQ505430	GQ505494	GQ505398
NRRL 66246 T	<i>F. tjaynera</i>	--	--	--	KP083266	KP083279	-

Nota: Abreviações das coleções de culturas: **ATCC**= American Type Culture Collection, Manassas, VA; **BBA**= Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Institute für Mikrobiologie, Berlin, Germany; **CBS**= Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; **CML**= Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; **FRC**= Fusarium Research Center, Pennsylvania State University, PA, EUA; **KSU**= University State Kansas, Manhattan, KS, EUA; **NRRL**= National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, EUA; **UTHSC**= University of Tennessee Health Science Center, TN, EUA. Outras Abreviações: FCSC-1= *Fusarium chlamydosporum* species complex- linhagem 1; FCSC-2= *Fusarium chlamydosporum* species complex- linhagem 2; FCSC-3= *Fusarium chlamydosporum* species complex- linhagem 3; FCSC-4= *Fusarium chlamydosporum* species complex- linhagem 4 (*F. nelsonii*); T = isolado tipo; (-) = isolado não sequenciado; x = isolado sequenciado; (--) = informação não encontrada

2.2 Análise filogenética

Todos os isolados monospóricos obtidos, além dos isolados de referência foram sequenciados para o fragmento do gene *fator de alongação 1- α* (*Tef1- α*). Com base nos agrupamentos gerados na análise filogenética, distribuição geográfica e hospedeiro foram selecionados 22 isolados para o sequenciamento dos fragmentos dos genes *RNA polimerase II* (*Rpb2*) e *Calmodulina* (*Cal*). A extração do DNA foi feita a partir dos isolados crescidos em Meio Extrato de Malte 2% líquido por três dias a 100 rpm a temperatura ambiente em um agitador orbital. A biomassa produzida foi filtrada e o DNA foi extraído utilizando o kit de extração de DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação do gene *Tef1- α* foi realizada utilizando os *primers* Ef-3 (forward; 5' -ATGGGTAAGGAGGACAAGAC - 3') e Ef-22 (reverse; 5' - GGAAGTACCAGTGATCATGTT - 3') gerando um fragmento de aproximadamente 600 pb (O'Donnell et al. 1998). Para o gene *Rpb2* utilizou-se os *primers* 5F2 (forward; 5' - GGGGWGAYCAGAAGAAGGC - 3') e 7cR (reverse; 5' - CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT - 3') gerando um fragmento de 860 pb (Liu et al., 1999) e para o gene *Cal* utilizou-se os *primers* CL1 (forward; 5' - GAGATATCAAGGAGGCCTTCTC - 3') e CL2A (reverse; 5' - TTTTGCATCATGAGTTGGAC - 3') gerando um fragmento de 680 pb (O'Donnell et al., 2000).

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa MACROGEN-EUA. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem (Hepperle, 2004) e as sequências consenso foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>).

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 6 (Tamura et al., 2011). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. As análises filogenéticas das sequências individuais e concatenadas foram realizadas pelo método de Máxima parcimônia (MP), por meio do programa MEGA 6. A análise das sequências concatenadas também foi realizada pelo método

de *Maximum Likelihood* (ML) utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica K2+G. Para verificação da confiabilidade dos ramos foi utilizado o teste de *bootstrap* com 1000 repetições. Sequências de referência correspondente ao gene *Tef1- α* , *Rpb2* e *Cal* das espécies do FCSC e de outras espécies de *Fusarium* depositadas no GenBank foram incluídas às análises e *F. concolor* foi utilizado como *outgroup* (Tabela 2).

2.3 Caracterização morfológica

A caracterização dos isolados foi realizada a partir do protocolo descrito por Leslie e Summerell (2006). Isolados monospóricos foram crescidos em placas de Petri contendo meio de Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 25°C, no escuro por 4 dias, para observação da taxa de crescimento e após 10 dias para avaliação da coloração da colônia. As características micromorfológicas como tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides; presença de clamidósporos e produção de microconídios em cadeias ou falsas cabeças, foram avaliadas em *Synthetic Nutrient-poor Agar* (SNA) a 20°C, sob fotoperíodo com luz branca fluorescente, após um período de 10 a 14 dias de incubação. Para indução da esporulação dos isolados, folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) estéreis foram transferidas para as colônias cultivadas em SNA. Foram mensurados 16 isolados, 10 representantes da linhagem FCSC-1, três representantes da linhagem FCSC-2 e três representantes da linhagem FCSC-3. Para cada isolado foram mensurados 10 macroconídios e microconídios.

2.4 Teste de colonização pela inflorescência

Quatro sementes de arroz da cultivar BRS-Esmeralda foram desinfestadas superficialmente (1 min em etanol 70%, 1 min em NaOCl 0,5% e lavadas por duas vezes em água esterilizada) e plantadas em vasos com capacidade para 10L contendo solo previamente adubado com calcário e NPK 8-28-16 e mantidas em casa-de-vegetação com temperatura média de 25°C e a umidade relativa ao redor de 60%. Foram utilizados quatro isolados de *F. chlamydosporum*, dois pertencentes a linhagem FCSC-1 e dois pertencentes a linhagem FCSC-2 e uma testemunha inoculada com água.

As panículas foram inoculadas no final da antese e enchimento do grão pelo método de aspersão. A suspensão de microconídios utilizada na inoculação foi ajustada para a concentração de 10^5 conídios/mL⁻¹. Após a inoculação, as plantas foram individualmente cobertas com saco plástico e incubadas a 25°C por 48 h. Posteriormente, os sacos plásticos foram retirados e as plantas foram mantidas em casa de vegetação até a maturação fisiológica.

Após a colheita e trilha manual, os tratamentos foram comparados quanto a incidência por meio da incubação de 200 grãos em substrato de papel (*Blotter Test*). Os grãos foram escolhidos aleatoriamente provenientes das panículas inoculadas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizados com duas repetições por tratamento (isolado), sendo cada tratamento constituído de um vaso com quatro plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar (Ferreira, 2011).

2.5 Testes de transmissão

2.5.1 Transmissão semente para plântula

Sementes de arroz da cultivar BRS-Esmeralda foram previamente desinfestadas (1 min em etanol 70%, 1 min em NaOCl 0,5% e lavadas por duas vezes em água esterilizada). Após secas foram embebidas em 10 mL de uma suspensão de microconídios (10^5 conídios/mL⁻¹) durante 18 horas a temperatura de 20°C sob agitação (100 rpm). Após foram colocadas em copos (550 ml) contendo substrato autoclavado (substrato comercial Tropstrato®). Foram utilizados quatro isolados de *F. chlamydosporum*, dois pertencentes a linhagem FCSC-1 e dois pertencente a linhagem FCSC-2 e uma testemunha inoculada com água. Para cada isolado foram feitas quatro repetições. Os copos foram mantidos em casa de vegetação durante 30 dias. O número de plântulas emergidas e a verificação da presença de sintomas foram observados 7, 14 e 21 e 28 dias após a inoculação.

Ao final dos trinta dias da inoculação as plântulas foram retiradas do substrato, e as raízes e as folhas foram medidas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento (isolado), sendo cada tratamento constituído de um copo com quatro plantas. Os dados foram submetidos à

análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar (Ferreira, 2011).

2.5.2 Transmissão semente para o grão

Sementes previamente inoculadas, como descrito anteriormente foram plantadas em vasos com capacidade para 10L contendo solo autoclavado e adubado (Calcário e NPK 8-28-16) e mantidas em casa de vegetação com temperatura média de 25°C e a umidade relativa ao redor de 60% durante todo seu ciclo (100 dias). Foram utilizados quatro isolados, dois pertencentes a linhagem 1 e dois pertencentes a linhagem 2, e uma testemunha. Após a colheita e trilha manual foi avaliado a translocação do fungo por meio da incubação de 200 grãos escolhidas aleatoriamente nas panículas, em substrato de papel (*Blotter Test*) para contabilizado o número de sementes infectadas pelo fungo inoculado. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizados com duas repetições por tratamento (isolado), sendo cada tratamento constituído de um vaso com quatro plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar (Ferreira, 2011).

2.6 Teste de germinação de sementes inoculadas

No teste de germinação de sementes de arroz foram utilizados quatro isolados de *F. chlamydosporum*, dois pertencentes à linhagem FCSC-1 e dois pertencente a linhagem FCSC-2 e a testemunha inoculada com água destilada autoclavada. As sementes foram previamente inoculadas como descrito anteriormente e foram utilizadas 100 sementes para cada isolado. As sementes inoculadas foram submetidas ao método de detecção por *Blotter Test*, a 25°C, fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro por 3 dias para determinar a porcentagem de sementes germinadas. Foram realizadas quatro repetições por isolado.

O resultados foram expressos em porcentagem de semente germinada. O percentual de sementes germinadas foi determinado afim de observar se o fungo inoculado afetou o poder germinativo das sementes e a eficiência do método de inoculação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias

comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar (Ferreira, 2011).

2.7 Determinação do potencial toxigênico para tricotecenos

2.7.1 Análise *in vitro*

Os isolados representantes das linhagens filogenéticas do complexo *F. chlamydosporum* foram quimiotipados, para produção dos tricotecenos (NIV, DON e suas formas acetiladas 3-ADON e 15-ADON) em cultivos em substrato artificial (meio de cultura BDA). A análise da produção de tricotecenos seguiu o protocolo descrito por Puri & Zhang (2010). Os isolados foram inoculados com discos (0,5 cm) de micélio em placas de Petri (60 x 90 mm) contendo 20 g de meio de cultura BDA por 15 dias. Foram preparadas duas placas para cada isolado.

As micotoxinas foram extraídas seguindo o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), proposto por Zachariasova et al. (2010), com modificações (Heidtmann-Bemvenuti et al., 2012). Os tricotecenos (DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV) foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com os obtidos no cromatogramas das amostras. Para confirmação de identidade do contaminante foi usada a co-cromatografia. A concentração dos contaminantes nas amostras foi estimada empregando curva analítica de padrões externos dos tricotecenos. Todas as determinações foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

3 RESULTADOS

3.1 Análise filogenética de isolados do FCSC

As árvores filogenéticas geradas pelo métodos de máxima parcimônia foram congruentes para as análises individuais e evidenciaram a presença de três linhagens filogeneticamente distintas. Primeiramente, foi realizada a análise de Máxima Parcimônia de sequências parciais do gene *Tef1- α* para os 83 isolados obtidos. As sequências apresentaram 406 pb, destes 165 eram sítios variáveis, 238 sítios conservados e 129 sítios informativos. Para as análises das regiões gênicas *Cal* e

Rpb2, foram utilizadas 22 sequências dos isolados estudados. As sequências de *Cal* continham 636 pb, destes 214 eram sítios variáveis, 417 sítios conservados e 108 sítios informativos e as sequências de *Rpb2* continham 911 pb, destes 273 eram sítios variáveis, 638 sítios conservados e 164 sítios informativos.

A topologia gerada pela análise *Tef1- α* de mostrou que 58 isolados agruparam-se com isolados de referência da linhagem FSSC-1 (*bootstrap* 95%), 9 agruparam com FCSC-2 (*bootstrap* 83%) e 13 isolados agruparam com FCSC-3 (*bootstrap* 100%). Nenhum isolado obtido agrupou com a linhagem FCSC-4, que representa a espécie *F. nelsonii* (Figura 1 - Material Suplementar; Tabela 1).

As topologias geradas das sequências combinadas obtidas pelos métodos de MP e ML foram congruentes. As árvores filogenéticas geradas utilizando sequências parciais dos genes *Tef1- α* e *Rpb2* concatenadas continham 1320 pb, 889 caracteres conservados, 427 variáveis e 245 sítios informativos e foram congruentes com a topologia das árvores individuais. Os clados formados foram fortemente suportados com valores de *bootstrap* de 99% para os clados FCSC-1 e FCSC-2 e 96% para o clado FCSC-3. A linhagem *ex-type* de *F. chlamydosporum* (CBS 145.25) agrupou com isolados representantes da linhagem FCSC-1 (Figura 1).

Para as análises filogenéticas utilizando o gene *Cal* não foi possível incluir sequências de isolados de referência da linhagem FCSC-3 (NRRL 43631), *F. aywerte* (RBG5743) e *F. tjaynera* (NRRL 66246), pois estas não estavam disponíveis no Genbank. As árvores filogenéticas geradas pelos métodos MP e ML a partir das sequências concatenadas dos genes *Tef1- α* , *Rpb2* e *Cal* (Figura 2) também foram congruente com árvores individuais e com as árvores combinadas de *Tef1- α* e *Rpb2*

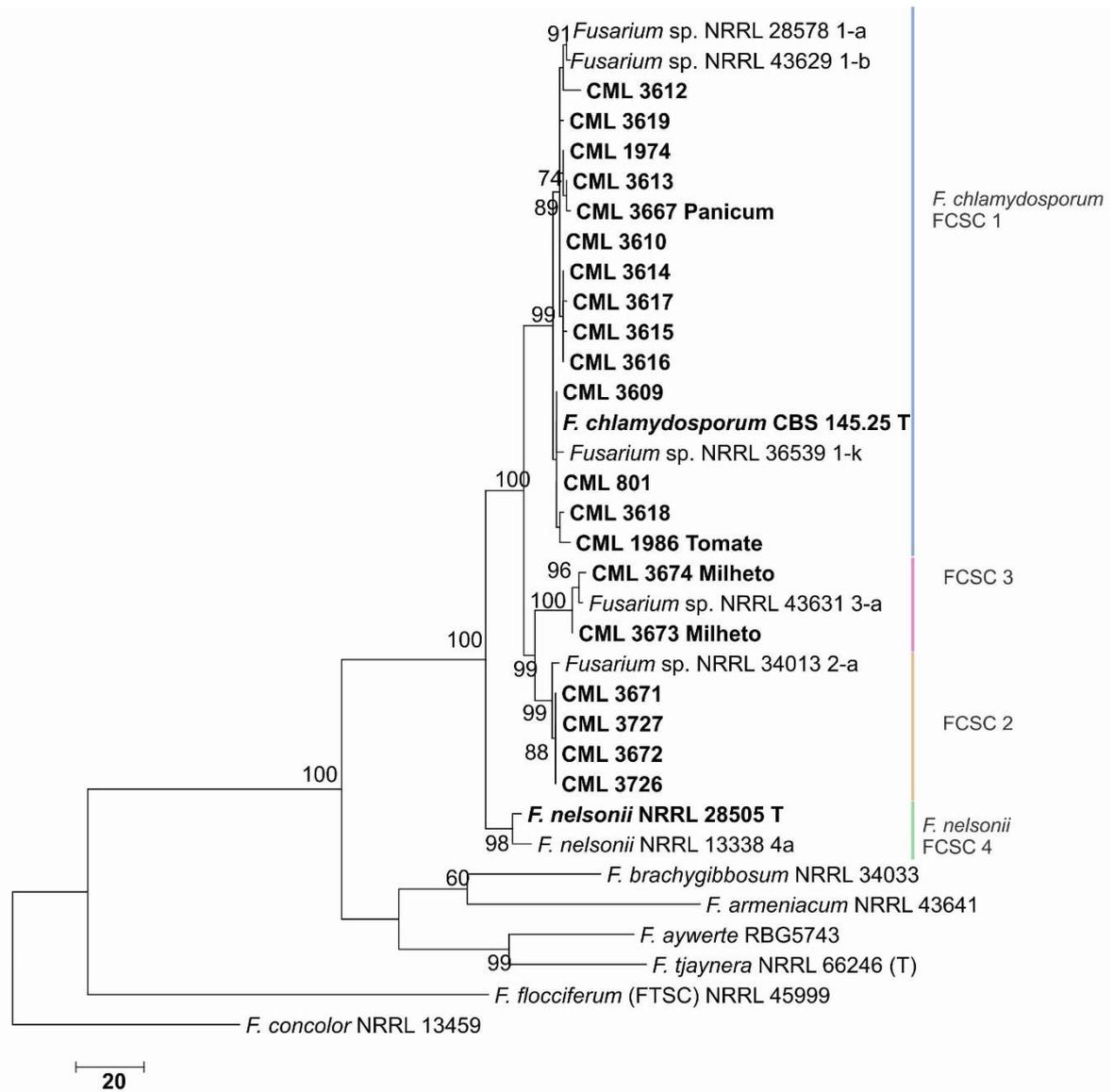


Figura 1. Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de sequências combinadas dos genes *Tef1-α* e *Rpb2* de isolados de *Fusarium chlamydosporum* obtidos nesse trabalho e isolados de referência. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CBS= Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CML= Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil; NRRL= Northern Regional Research Laboratory, NCAUR, Peoria, IL, EUA.

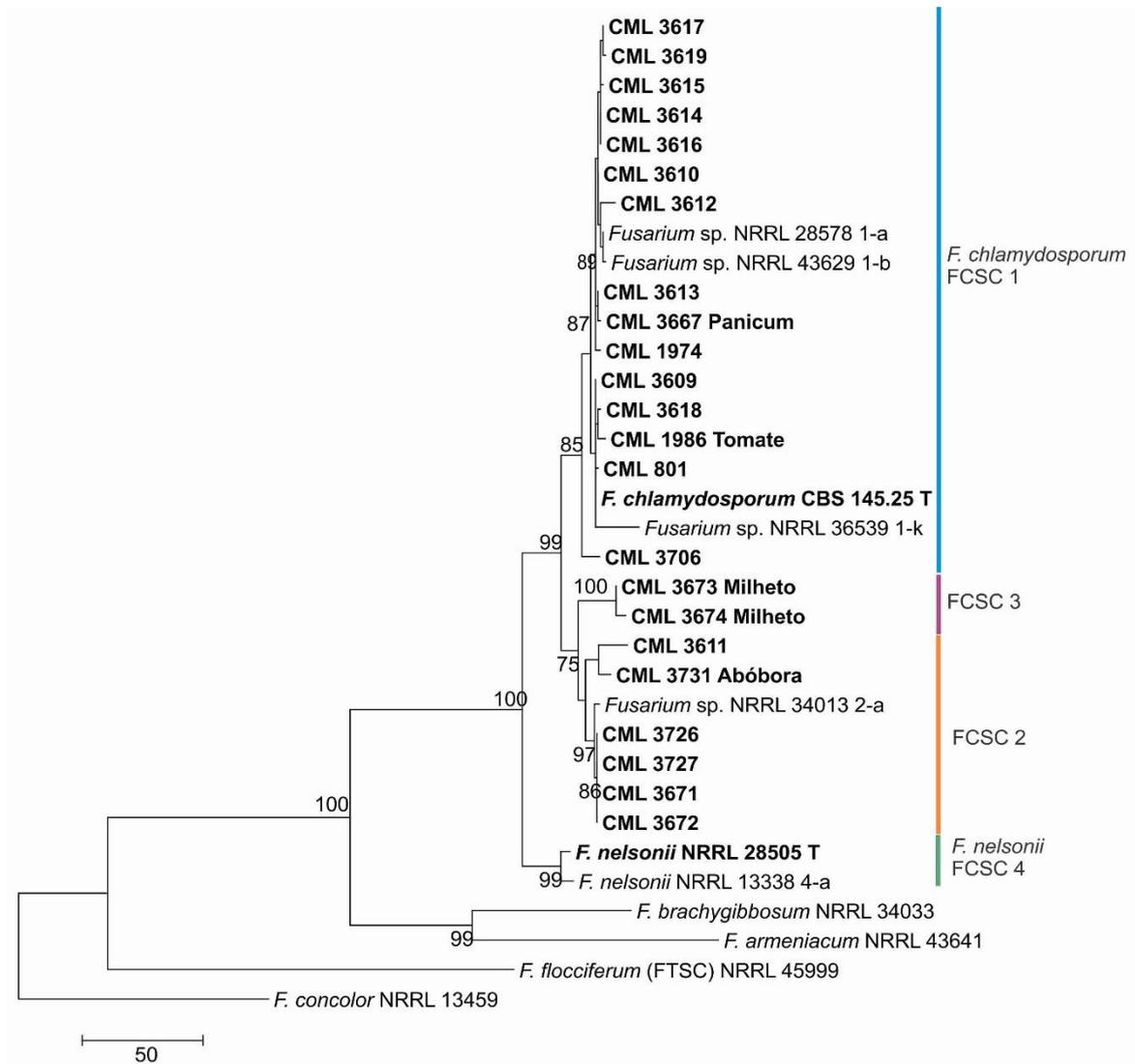


Figura 2. Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de seqüências combinadas dos genes *Tef1-α*, *Rpb2* e *Cal* de isolados de *Fusarium chlamydosporum* obtidos nesse trabalho e isolados de referência. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CBS= Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CML= Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil; NRRL= Northern Regional Research Laboratory, NCAUR, Peoria, IL, EUA.

3.2 Caracterização morfológica

Com base nos caracteres macromorfológicos e micromorfológicos da fase assexuada foi possível distinguir os isolados pertencentes a FCSC dos outros complexos, FFSC e FGSC. Entretanto, não foi encontrado marcador morfológico para distinguir as linhagens filogenéticas do FCSC.

Em meio de cultura BDA, os isolados apresentaram coloração inicial creme, podendo ou não evoluir para rosa púrpura. A taxa de crescimento médio variou de 3,9 - 5 mm/dia. Em SNA, os isolados apresentaram abundante produção de microconídios no micélio aéreo a partir de monofiálides e polifiálides. Os microconídios apresentaram formato oval com 0-1 septo e tamanho variando de 5.5-9.5 x 2,5-4 μm . Os clamidósporos também foram produzidos em abundância, solitários, em pares ou em cadeias. Os macroconídios eram esporadicamente produzidos e apresentavam célula apical reto ou ligeiramente curvado com 3-5 septos e tamanho variando de 32-38 x 3.5-4.0 μm (Figura 3).

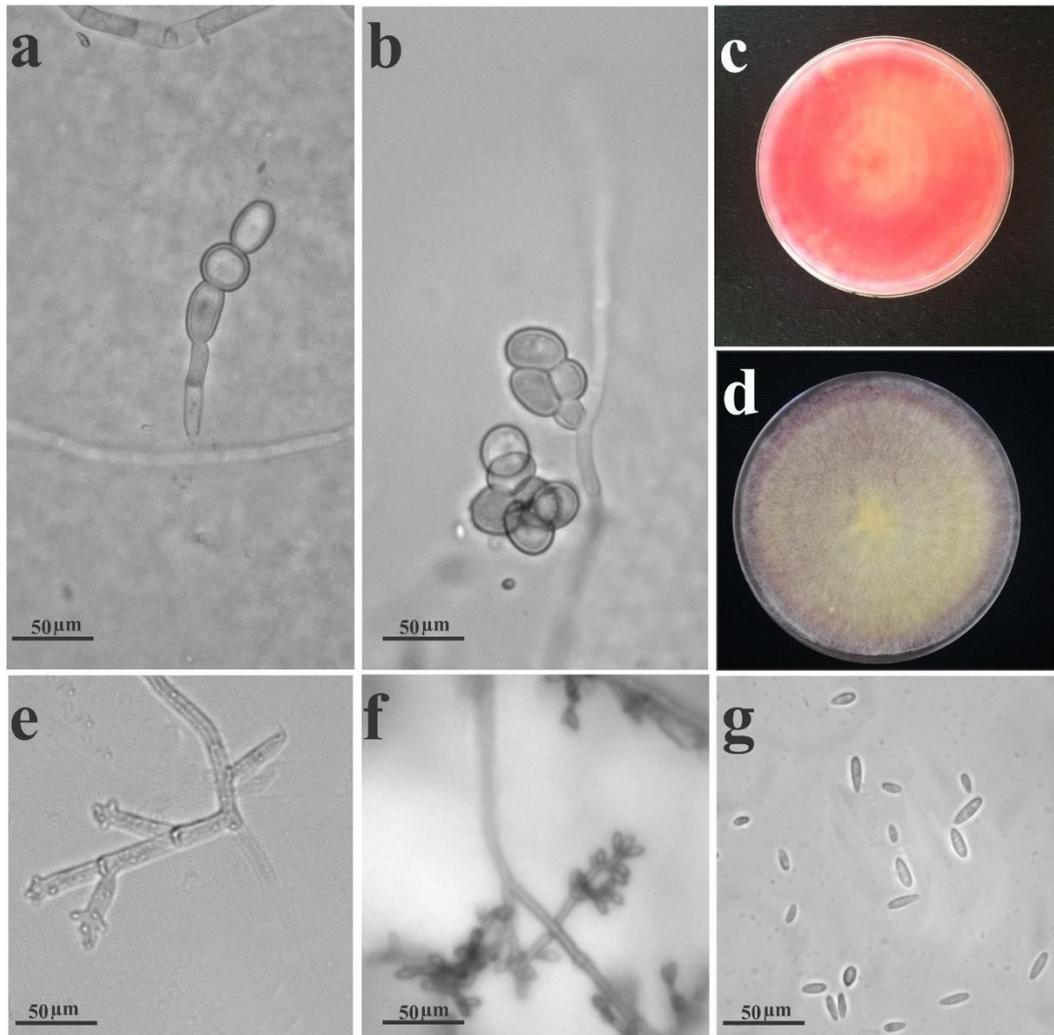


Figura 3. Morfologia de *Fusarium chlamydosporum*. A-B: Clamidósporos em cadeia; C-D: Coloração em placas de BDA; E: Polifialídes; F: microconídio no micélio aéreo; G: microconídios de 0-1 septos.

3.3 Testes de colonização, transmissão e germinação

Não foram observados sintomas nas panículas inoculadas até o momento da colheita nas condições testadas. Na análise de incidência dos grãos colhidos, os isolados CML 3611 e CML 3671 ambos pertencentes a linhagem FCSC-2 apresentaram as maiores taxas de incidência de 24% e 20%, respectivamente (Tabela 3). Também não foi observado nenhum sintoma durante o período de avaliação das plântulas de arroz nas condições avaliadas. Ao final dos 28 dias à altura das folhas e o comprimento das raízes das plântulas inoculadas não apresentaram diferença estatística em relação a testemunha. Quando as plântulas foram seccionadas foi possível observar o desenvolvimento do micélio nas raízes e nos colmos.

Não foi observado nenhum sintoma no decorrer de todo o desenvolvimento da planta (110 dias) nas condições avaliadas, enquanto que foi possível reisolar representantes das duas linhagens inoculadas, dos grãos colhidos. De 800 grãos avaliados, em 26 foi possível reisolar o fungo. O isolado CML 3706 (FCSC-1) foi recuperado de 16 grãos, ou seja, foi o isolado que mais translocou da semente para o grão. O isolado CML 3611 (FCSC-2) foi reisolado de dois grãos (Tabela 5).

Na avaliação da germinação, as duas linhagens de *F. chlamydosporum* testadas reduziram a germinação das sementes em comparação com a testemunha. Os isolados CML 3619 (FCSC-1) e CML 3671 (FCSC-2) apresentaram diferença estatística em relação a testemunha, reduzindo 24% a 28% a germinação das sementes, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 3. Incidência em grãos, altura da planta, comprimento de raiz e germinação de sementes de arroz inoculadas com isolados de FCSC.

Código CML ¹	Espécie ²	Incidência ³ (%)	Altura da PA (cm) ⁴	Comprimento de raiz (cm)	Germinação (%) ⁵	Incidência de grãos contaminados (%) ⁶
CML 3619	FCSC 1	14,7±1,3	21,66±0,36 a*	13,85±0,36 a	76±1,5 ab*	2
CML 3706	FCSC 1	12,25±4,2	22,7±0,40 a	16,09±0,40 a	72±2,0 a	8
CML 3611	FCSC 2	24±2,5	22,39±0,5 a	15,42±0,48 a	72±4,5 a	1
CML 3671	FCSC 2	19,75±3,2	23,08±0,46 a	14,41±1,23 a	73±4,5 ab	2
Testemunha	-	0±0	20,05±0,22 a	13,9±0,59 a	92,5±1,25 b	0
CV (%)	-		12,4	11,68	11,7	

¹CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; ²FCSC-1= *Fusarium chlamydosporum* species complex-linhagem 1; FCSC-2= *Fusarium chlamydosporum* species complex-linhagem 2; ³Incidência avaliada em 200 grãos provenientes de panículas inoculadas, ⁴Altura PA= Altura da parte aérea, ⁵Germinação avaliada em 200 sementes inoculadas, ⁶Avaliação feita em 200 grãos obtidos de plantas de arroz provenientes de sementes inoculadas, * Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

3.4 Caracterização do potencial toxigênico para tricotecenos

Dos 30 isolados representantes das 4 linhagens do FCSC selecionados para análise *in vitro* de tricotecenos, 16 foram positivos. Destes, 11 produziram tricotecenos do tipo B (DON, 3-ADON e 15-ADON), cinco isolados produziram abaixo do limite de quantificação do espectrofotômetro. Para isolados representantes da linhagem 1 predominou a produção de 15-ADON variou de 110 µg/kg para o isolado CML 3617 e 890 µg/kg para o isolado CML 3612 e cinco isolados produziram NIV, no entanto a quantidade foi abaixo do limite de detecção. Um isolado da linhagem 2 (CML 3611) produziu DON. Os dois isolados obtidos de milho da linhagem FCSC-3, CML 3673 e CML 3674, produziram somente 3-ADON e os valores variam entre 201 e 293 µg/kg respectivamente. Os dois isolados de *F. nelsonii* (FCSC-4) testados produziram DON, o isolado CML 1971 produziu 713 µg/kg e o isolado CML 1985 produziu DON e 3-ADON respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Média da produção de tricotecenos de *Fusarium chlamydosporum* cultivado em meio sintético (BDA), quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência

Código CML ¹	Espécie ²	Hospedeiro	Tricotecenos (µg/kg) ³			
			NIV	DON	3-ADON	15-ADON
CML 3609	FCSC 1	Arroz	ND	<LOQ	ND	ND
CML 3610	FCSC 1	Arroz	ND	<LOQ	ND	ND
CML 3612	FCSC 1	Arroz	<LOQ	ND	ND	890
CML 3613	FCSC 1	Arroz	<LOQ	<LOQ	ND	293
CML 3614	FCSC 1	Arroz	ND	ND	ND	377
CML 3615	FCSC 1	Arroz	ND	ND	ND	512
CML 3616	FCSC 1	Arroz	ND	ND	ND	796
CML 3617	FCSC 1	Arroz	ND	ND	ND	110
CML 3630	FCSC 1	Arroz	<LOQ	ND	ND	ND
CML 3631	FCSC 1	Arroz	<LOQ	ND	ND	ND
CML 3632	FCSC 1	Arroz	<LOQ	ND	ND	ND
CML 3611	FCSC 2	Arroz	ND	254	ND	ND
CML 3673	FCSC 3	Milheto	ND	201	ND	ND
CML 3674	FCSC 3	Milheto	ND	293	ND	ND
CML 1971	FCSC 4	-	ND	713	<LOQ	ND
CML 1985	FCSC 4	-	ND	1005	248	ND
Testemunha	FFSC	-	ND	ND	ND	ND
BDA sintético	-	-	ND	ND	ND	ND

¹ CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; ² FCSC-1 = *Fusarium chlamydosporum* species complex - linhagem 1; FCSC-2 = *Fusarium chlamydosporum* species complex - linhagem 2; FCSC-3 = *Fusarium chlamydosporum* species complex - linhagem 3; FCSC-4 = *Fusarium chlamydosporum* species complex - linhagem 4; ³ Valor médio de tricotecenos, DON = deoxinivalenol; 3-ADON = 3-Acetil-deoxinivalenol; 15-ADON = 15-Acetil-deoxinivalenol; NIV = Nivalenol; ⁴ ND = Não detectado; ⁵ <LOQ = abaixo do limite de quantificação; ⁶(-) = hospedeiro desconhecido.

Quanto à produção de tricotecenos *in vivo*, das 23 amostras de grãos de arroz analisadas, dez foram positivas. Destas, quatro produziram DON de forma quantificável, variando de 499 a 1304 µg/kg e seis amostras produziram abaixo do limite de quantificação do espectrofotômetro. Não houve relação entre a produção de tricotecenos e a incidência dos complexos de espécies, sendo que o FCSC foi o complexo menos frequente (Tabela 5).

Tabela 5. Média de produção de deoxinivalenol por complexos de espécies encontrados em amostras de grãos de arroz dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Tocantins, quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência

Município	Estado ¹	DON ² (µg/kg)	15-ADON (µg/kg)	3-ADON (µg/kg)	DON total (µg/kg)	FCSC	FGSC	FIESC
Arambaré	RS	499,0	ND ³	ND	499,0	0	4	0
Glorinha	RS	1304,0	ND	ND	1304,0	1	1	1
Glorinha	RS	<LOQ ⁴	ND	ND	<LOQ	2	3	4
Palma	RS	ND	ND	ND	ND	0	10	3
Pelotas	RS	ND	ND	<LOQ	<LOQ	1	3	0
Pelotas	RS	ND	ND	<LOQ	<LOQ	1	0	1
Pelotas	RS	ND	ND	ND	ND	0	3	0
Santa Maria	RS	ND	ND	ND	ND	1	2	3
São Sepé	RS	ND	ND	ND	ND	0	8	2
Garuva	SC	<LOQ	ND	ND	<LOQ	0	1	0
Garuva	SC	1104,0	ND	ND	1104,0	0	1	0
Itajaí	SC	ND	ND	ND	ND	2	19	4
Itajaí	SC	ND	ND	ND	ND	0	3	1
Itajaí	SC	ND	ND	ND	ND	0	2	0
Jacinto Machado	SC	ND	ND	ND	ND	0	5	1
Nova Veneza	SC	ND	ND	ND	ND	0	7	0
Nova Veneza	SC	ND	ND	ND	ND	1	5	4
Nova Veneza	SC	<LOQ	ND	ND	<LOQ	0	9	2
Nova Veneza	SC	<LOQ	ND	543,0	543,1	1	5	0
Formoso do Araguaia	TO	ND	ND	ND	ND	0	0	1
Lagoa da Confusão	TO	ND	ND	ND	ND	3	0	0
Lagoa da Confusão	TO	ND	<LOQ	ND	<LOQ	3	2	0
Lagoa da Confusão	TO	ND	ND	ND	ND	0	0	1

¹ RS= Rio Grande do Sul; SC= Santa Catarina; TO= Tocantins; ² DON= deoxinivalenol; 3-ADON=3-Acetil-deoxinivalenol; 15-ADON=15-Acetil-deoxinivalenol; ³ ND=Não detectado; ⁴ <LOQ= abaixo do limite de quantificação.

4 DISCUSSÃO

4.1 Filogenia

Esse trabalho é pioneiro no estudo do complexo *Fusarium chlamydosporum*, confirmando a ocorrência de três linhagens distintas em associação com plantas como o arroz. Com base nos resultados de filogenia de multilocus foi evidenciada a presença de três linhagens do FCSC a partir de uma coleção de 72 isolados de *Fusarium chlamydosporum*, obtidos de grão de arroz e demais hospedeiros provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Em um estudo feito com isolados de ambiente clínico, o FCSC é representado por três linhagens filogeneticamente distintas, designadas como FCSC 1, 2 e 3 (O'Donnell et al., 2009). A quarta linhagem (FCSC-4) é representada pela espécie *F. nelsonii* (Marasas et al., 1998), encontrada na África do Sul em solo e material vegetal. A linhagem 1 do FCSC representa a espécie *F. chlamydosporum* com base nas análises das sequências parciais dos genes *Tef1-α*, *Rpb2* e *Cal*, por incluir a linhagem *ex-type* CBS 145.25, obtido de caule de bananeira em Honduras. O maior número de isolados do arroz agruparam na linhagem FCSC-1, além do isolado de panicum e de solo de cultivo de soja. No FCSC-2 agruparam isolados do arroz e de abóbora e no FCSC-3 agruparam isolados oriundos de arroz e milho, esses provenientes de Roraima. As linhagens irmãs FCSC-2 e FCSC-3 devem ser descritas como espécies futuramente. Um grupo irmão é formado por duas espécies relatadas da Austrália, *F. tjaynera*, encontrada em *Sorghum* e solo, e *F. aywerte*, ocorrendo em associação com gramíneas (Laurence et al., 2015).

4.2 Morfologia

Os isolados representares das linhagens FCSC 1, 2 e 3 avaliados morfológicamente apresentaram as mesmas características de *F. chlamydosporum* descritas por (Nelson et al., 1983; Leslie & Summerell, 2009). A pigmentação na colônia, igualmente, confere com a relatada pelos autores, que poderia variar de rosa, carmim, vermelho-vinho e vermelho amarronzado. Portanto não existe marcador morfológico para distinguir estas três linhagens. Entretanto a linhagem FCSC-4, *F. nelsonii*, possui mesoconídio fusiforme no micélio aéreo e a produção de

esporodóquio alaranjado, que o distingue das demais linhagens do FCSC (Marasas et al., 1998).

4.3 Testes de colonização e transmissão

As linhagens FCSC-1 e FCSC-2 que foram testadas neste trabalho apresentaram um *lifestyle* endófito no arroz. Nas inoculações nas panículas foi observado manchas nos grãos, no entanto, mostrando assim que o fungo quando inoculado na inflorescência pode colonizar o grão. Semelhante foi observado por Ducan e Howard (2009) observarem que esporos de *F. verticillioides* aderem sobre o grão de pólen, formando um emaranhado de hifas, ganhando acesso ao grão via canal do estigma em milho. Em trigo, a antese é a fase mais suscetível as infecções por *F. graminearum* e as anteras do trigo são o principal sítio de infecção onde substâncias do hospedeiro podem favorecer o desenvolvimento do patógeno (Sutton, 1982; Strange & Smith, 1971)

Foi evidenciado também que *F. chlamydosporum* não é um patógeno quando associado a parte vegetativa, causando apenas manchas nos grãos, no entanto afeta a germinação. Semelhante foi observado por Prabhu e Vieira (1989) com isolados de *Drechslera oryzae* (*Bipolaris oryzae*) em arroz, que causa manchas nos grão, interfere na germinação é transmitido via sementes e coloniza de forma sistêmica. Mesmo havendo a redução na germinação das sementes os valores obtidos são considerados dentro do limite de germinação instituído pela instrução normativa nº 45 de 17 de setembro de 2013, que estabelece padrões de qualidades de comercialização de sementes com até 70% de germinação.

Na Índia, espécies de *Fusarium* associados a sementes de arroz foram testados quanto a capacidade de redução de germinação e o vigor das plântulas, isolados de *F. chlamydosporum* reduziu 78% a germinação de sementes e também afetou o vigor das plântulas, mesmo assim em comparação com outros fungos, essa foi a espécie que menos afetou o desenvolvimento das plantas (Islam & Borthakur, 2012).

Nos testes de transmissão não foi observado nenhum sintoma nas condições avaliadas e foi possível comprovar a transmissão do fungo da semente para a plântula e da semente para o grão, ou seja, espécies do FCSC além de terem seu "*lifestyle*"

endofítico, podem colonizar de forma sistêmica plantas de arroz. A transmissão de forma sistêmica já foi observada também com isolados de *Fusarium verticillioides* em milho, mostrando que a infecção pode ser iniciada sob uma ampla gama de condições de temperatura (Wilke et al., 2007)

4.4 Micotoxinas

A produção de micotoxinas por *F. chlamydosporum* foi evidenciada genotipicamente por Moretti et al. (2013) ao verificar a presença dos genes do cluster *TRI*, responsáveis pela biossíntese de tricotecenos. A evidência filogenética foi abordada por O'Donnell et al. (2013) ao agrupar o FCSC com demais complexos já identificados como produtores de tricotecenos, como por exemplo o complexo de espécies *Fusarium graminearum* (FGSC) e *F. incarnatum-equiseti* (FIESC), nenhum dos isolados de *F. chlamydosporum* testados produziram tricotecenos, mesmo possuindo o gene *Tri5*, levando os autores a formularem duas hipóteses: Os membros do FCSC perderam a capacidade de produzir tricotecenos ou eles produzem em condições mais restritas.

A primeira hipótese proposta pelos autores foi refutada neste trabalho uma vez que isolados do FCSC oriundos do arroz e de outros hospedeiros produziram de tricotecenos do tipo B quando avaliados *in vitro*. Os metabólitos secundários são produtos de vias bioquímicas de múltiplos passos que podem começar com uma síntese de terpeno que catalisa um metabólito primário para formar uma molécula mais complexa. Essas moléculas sofrem uma série de modificações enzimáticas para formar estrutura de micotoxina (Moretti et al., 2013). Os cluster de genes biossintéticos também podem codificar proteínas de transporte de metabólitos e fatores de transcrição que regulam a expressão dos clusters gênicos, portanto, o elemento biológico biossintético é o elemento genético essencial para a produção da maioria das micotoxinas e a presença ou ausência desse cluster em determinada espécie de fungo é a chave para produção de micotoxina (Moretti et al., 2013).

Na avaliação *in vitro* de 30 isolados, 16 produziram micotoxina, ou seja, nem todos os isolados de *F. chlamydosporum* produziram. Assim, a relação fungo/micotoxina é complexa e depende de fatores múltiplos, que atuam por um longo período desde a infecção da planta até a colheita e o armazenamento, podendo alterar

a dinâmica do acúmulo de micotoxina nos grãos (Furlong et al., 1995). Alguns autores tem demonstrado correlação significativa entre a concentração de ergosterol com a síntese de tricotecenos, pois níveis baixos de ergosterol indicam que o fungo está sofrendo algum tipo de estresse potencializando a produção de micotoxina (Heidtmann-Bemvenuti et al., 2012; Nielsen et al., 2012).

Na quantificação de micotoxinas, a partir de amostras de grãos de arroz oriundos dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Tocantins, não foi possível estabelecer uma relação entre a quantidade de micotoxina com os complexos de espécies encontrados (Tabela 7). Diversos fatores ambientais também podem estar relacionados com essa baixa produção de micotoxinas, o clima e até mesmo variações locais de temperatura, podem afetar a distribuição das espécies de *Fusarium* e o seu potencial toxigênico (Desjardins et al., 2000; Backhouse, 2014). Em um estudo de modelagem do efeito do clima na distribuição geográfica global de três espécies do complexo (*F. graminearum*, *F. asiaticum* e *F. boothii*) foi modelada a influência do clima na distribuição das espécies, sugerindo que *F. graminearum* é mais predominante no Norte da Ásia onde predomina temperaturas mais amenas e *F. asiaticum* no Sul da Ásia, onde as temperaturas são mais altas (Backhouse, 2014). Além disso, fungos que contaminam amostras no campo podem ser substituídos por outros gêneros mais adaptados às condições de armazenamento, porém a micotoxina pode permanecer (Pitt et al., 1997).

Assim, os resultados deste trabalho comprovam a capacidade de isolados do FCSC em produzir tricotecenos do tipo B. No entanto, a hipótese inicial do trabalho de que espécies do FCSC poderiam contribuir para a contaminação de DON em amostras de arroz no Brasil precisa ser melhor investigada.

5 CONCLUSÃO

Três linhagens do FCSC estão presentes em amostras de grãos de arroz no Brasil;

A espécie *Fusarium chlamydosporum* é representada pela linhagem 1 do FCSC;

Não foi possível distinguir morfologicamente as três linhagens encontradas.

Os membros do complexo de espécies *Fusarium chlamydosporum* produzem tricotecenos do tipo B *in vitro*;

Fusarium chlamydosporum e as linhagens associadas colonizam plantas de arroz como endófitos, atuando de forma sistêmica em plantas de arroz.

REFERÊNCIAS

- Agarwal PC, Mortensen CN, Mathur SB (1998). Seed-borne Diseases and Seed Health Testing of Rice. CAB International Mycological Institute, Copenhagen, Denmark: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries; and Kew, UK.
- Amatulli MT, Spadaro D, Gullino ML, Garibaldi A (2012). Conventional and real-time PCR for the identification of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum* from diseased rice tissues and seeds. European journal of Plant Pathology 134:401-408.
- Backhouse D (2014). Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. European Journal of Plant Pathology 139:161–73.
- Broggi LE, Moltó GA (2001). Fungi associated with rice at entre rios province, Argentina. toxigenic capacity of *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale* isolates Mycotoxin Research 17:96-107.
- Carter LLA, Leslie JF, Webster RK (2008). Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and water Grass. Phytopathology 98:992-998.
- Desjardins AE, Manandhar HK, Plattner RD, Manandhar GG, Poling SM, Maragos CM, (2000). *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. Applied and Environmental Microbiology 66:1020-1025.
- Desjardins AE (2006). *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society, St. Paul MN. 230p
- Elmer WH (2001). *Fusarium* diseases of asparagus. In: Summerell BA et al. (eds.) *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. American Phytopathological Society, St. Paul MN. pp.248-262.
- FAOSTAT Online Database (2016) <http://faostat.fao.org/>
- Ferreira DF (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia 35:1039-1042.
- Furlong EB, Soares LMV, Lasca CC, Kohara EY (1995). Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of Sao Paulo, Brazil. Mycopathologia 131:185-190.
- Gerlach W, Nirenberg H (1982). The genus *Fusarium*: a pictorial atlas (Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fur Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem). Berlin: Kommissionsverlag P Parey 209:1-406

Gomes LB, Ward TJ, Badiale-Furlong E, Del Ponte EM (2015). Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. *Plant Pathology* 64:980-987.

Heidtmann-Bemvenuti R, dos Santos Hackbart HC, de Souza MM, Badiale-Furlong E, Dors GC, Fagundes CA (2012). Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. *Quimica Nova* 35:1244–9.

Hepperle D (2004). SeqAssem^a. Win32-Version. A Sequence Analysis Tool Contig Assembler and Trace Data Visualization Tool for Molecular Sequences Disponível em: <http://www.sequentix.de>

Islam NF, Borthakur SK (2012). Screening of mycota associated with Aijung rice seed and their effects on seed germination and seedling vigour. *Plant Pathol Quar* 2:75-85.

Katsurayama AM, Taniwaki MH (2017). Fungi and aflatoxins in rice: occurrence and significance to consumer health. *Brazilian Journal of Food Technology* 20:2-13.

Leslie JF, Summerell BA (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishers, Ames IA.

Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:799-1808.

Makun HA, Dutton M, Njobeh PB, Phoku JZ, Yah CS (2011). Incidence, phylogeny and mycotoxigenic potentials of fungi isolated from rice in Niger State, Nigeria. *Journal of Food Safety* 31:334-349.

Marasas WFO, Rheeder JP, Logrieco A, Van Wyk PS, Juba JH (1998). *Fusarium nelsonii* and *F. musarum*: two new species in section *Arthrosporiella* related to *F. camptoceras*. *Mycologia* 90:505-513.

Moretti A, Susca A, Mulé G, Logrieco AF, Proctor RH (2013). Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *International Journal of Food Microbiology* 167:57-66.

Nahar S, Mustaq M (2006). Pathogenicity and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species (sec *Liseola* and *Sporotrichiella*) in sunflower. *Pakistan Journal of Botany* 38:487-492.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983). *Fusarium Species: an illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University. University Park.

Nielsen LK, Jensen JD, Rodríguez A, Jorgensen LN, Justesen AF (2012). TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes

- of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 157:384-392.
- Nucci M, Anaissie E (2007). *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews* 20:695-704.
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik EA (2000). Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM (2009). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 47:3851-3861.
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Robert VA (2013). Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52:20-31.
- Ok HE, Kim DM, Kim D, Chung SH, Chung MS, Park KH, Chun HS (2014). Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control* 37:284-291.
- Palmero D, Iglesias C, de Cara M, Lomas T, Santos M, Tello JC (2009). Species of *Fusarium* isolated from river and sea water of southeastern Spain and pathogenicity on four plant species. *Plant Disease* 93:377-385.
- Pitt JI, Hocking AD (1997). *Fungi and food spoilage* (2nd ed.). London, UK: Blackie Academic and Professional, 596 pp.
- Prabhu AS, Vieira NDA (1989). Sementes de arroz infectadas por *Drechslera oryzae*: germinação, transmissão e controle. *Embrapa Arroz e Feijão-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP 7:39p.
- Puri KD, Zhong S (2010). The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. *Phytopathology* 100:1007-1014.
- Savard ME, Miller JD, Salleh B, Strange RN (1990). Chlamydosporol, a new metabolite from *Fusarium chlamydosporum*. *Mycopathologia* 110:177-181.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Triest D, Piérard D, De Cremer K, Hendrickx M (2016). *Fusarium musae* infected banana fruits as potential source of human fusariosis: may occur more frequently than we might think and hypotheses about infection. *Communicative & Integrative Biology* 9:1162934-6.

Wilke AL, Bronson CR, Tomas A, Munkvold GP (2007). Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Disease* 91:1109-1115.

Wollenweber HW, Reinking OA (1925). Aliquot Fusaria Tropicalia Nova Vel Revisa. *Phytopathology* 15:155-169.

Zachariasova M, Lacina O, Malachova A, Kostelanska M, Poutska J, Godula M, Hajslova J (2010). Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 662:51-61.

ANEXO

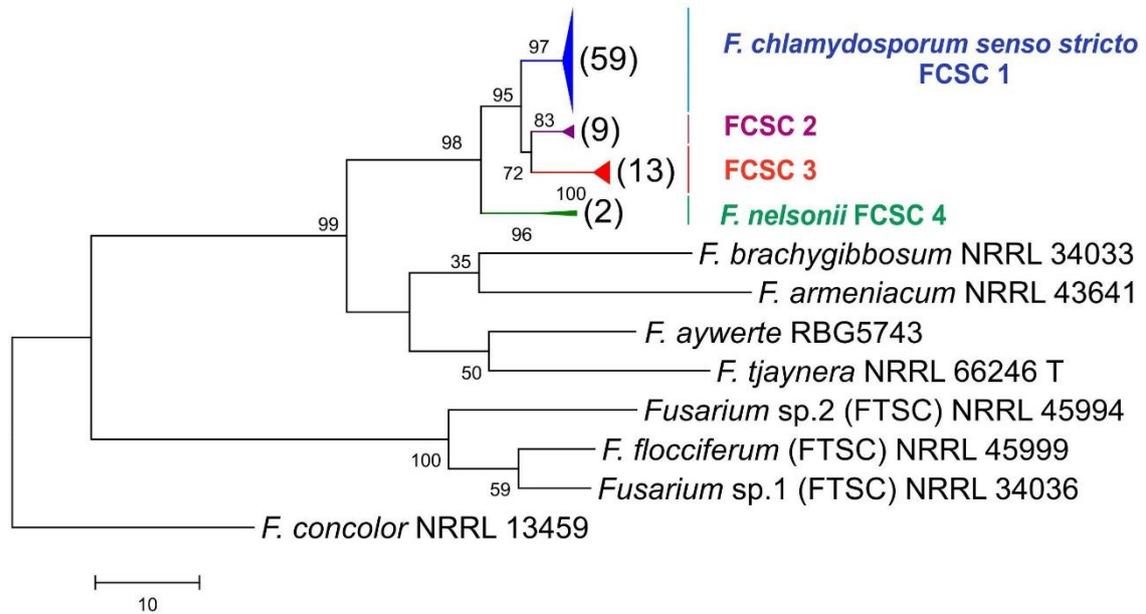


Figura 1 A- Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de sequências da região *Tef1-α* de isolados de *Fusarium chlamydosporum* obtidos nesse trabalho e isolados de referência. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CML= Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; NRRL= Northern Regional Research Laboratory Peoria, IL, EUA; CBS= Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

CURRÍCULO DA AUTORA

Larissa Bitencourt Gomes é natural de Porto Alegre RS, onde nasceu em 1986. Em 2003 ingressou no curso Técnico em Agricultura na Escola Estadual Técnica de Agricultura (ETA), concluído em 2005. Durante esse período, realizou estágio no Laboratório de Diagnose Fitossanitária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Em 2005, ingressou no curso de Biologia na Universidade Luterana do Brasil. Trabalhou durante todo o curso no Laboratório de Diagnose Fitossanitário - Agronômica. Concluída a graduação em 2008, ingressou no mesmo ano no curso de Especialização em Manejo integrado de pragas e doenças de Plantas na UFRGS. Concluído o curso em 2010, iniciou suas atividades como bolsista DTI no Laboratório de Epidemiologia da UFRGS até 2012. No mesmo ano obteve uma vaga no curso de Mestrado em Fitotecnia sob orientação do professor Emerson Medeiros Del Ponte. Em 2014 iniciou o curso de doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras, sob orientação do professor Ludwig H. Pfenning.