



FILIPE SANDIN DO CARMO

**ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A GRAMÍNEAS
FORRAGEIRAS**

LAVRAS – MG

2017

FILIPE SANDIN DO CARMO

ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

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).

Carmo, Filipe Sandin do.

Espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas forrageiras / Filipe Sandin do Carmo. - 2017.

44 p. : il.

Orientador: Ludwig H. Pfenning.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Fusarium*. 2. Fungos Endófitos. 3. Gramíneas Forrageiras. I. Pfenning, Ludwig Heinrich. . II. Título.

FILIPE SANDIN DO CARMO

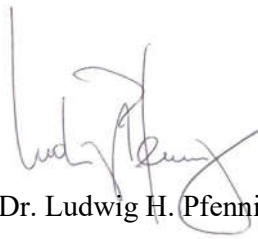
ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS

***Fusarium* SPECIES ASSOCIATED WITH FORAGE GRASSES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de março de 2017.

Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães	UFLA
Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA
Dr. Dauri José Tessmann	UEM



Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

LAVRAS-MG

2017

Aos meus pais, Paulo (in memoriam) e Marlene

Aos meus irmãos Tadeu e Luis Paulo

A minha namorada Jeani

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades e bênçãos que sempre me concedeu.

Ao Professor Ludwig H. Pfenning pela orientação, paciência, amizade, dedicação e seus ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, que se dispuseram a participar.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho, pelo companheirismo e aprendizado.

Aos meus pais, Paulo (*in memoriam*) e Marlene, que me acompanharam nesta trajetória, dando todo apoio e incentivo. Sempre terão o meu reconhecimento.

Aos meus irmãos e a minha namorada pelo companheirismo, apoio, carinho e incentivo.

Aos familiares, amigos que sempre acreditaram em mim.

Enfim, agradeço a todos que participaram dessa etapa da minha vida, aos quais eu dedico essa conquista. Obrigado!

RESUMO

Gramíneas do gênero *Brachiaria* e *Panicum* são utilizadas não somente como forrageiras, mas também em consórcio com outras culturas e como palhada no plantio direto. Diversas espécies de *Fusarium* são encontradas em associação a gramíneas como endófitos ou patógenos. Algumas dessas espécies são conhecidas por seu potencial de produzir micotoxinas. Este trabalho se propõe a responder às seguintes questões: (i.) quais espécies de *Fusarium* estão associadas a gramíneas forrageiras? (ii.) as forrageiras podem ser reservatório de espécies patogênicas a outras plantas? (iii.) as possíveis novas linhagens associadas a *Brachiaria* são potenciais produtoras de micotoxinas? Os objetivos foram (i.) averiguar quais espécies de *Fusarium* ocorrem em associação com gramíneas forrageiras dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* de diferentes regiões do Brasil, usando filogenia molecular e caracterização morfológica e (ii.) verificar a capacidade de produção de micotoxinas das espécies encontradas. Os 63 isolados obtidos de sementes, folhas e colmos foram identificados por meio de análise filogenética das regiões gênicas *EF-1 α* e *RPB2*, e avaliação dos marcadores morfológicos como *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* e *F. chlamydosporum*. A espécie *F. mundagurra*, recentemente descrita na Austrália, tem nesse estudo o seu segundo registro. Foram encontradas ainda mais três novas linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC), denominadas como *Fusarium* sp. 1, *Fusarium* sp. 2 e *Fusarium* “*claudionori*”. Todas as espécies e linhagens do FFSC analisadas, inclusive *F. mundagurra*, *F. “claudionori”* e *Fusarium* sp. 1, produziram as micotoxinas fumonisinas e moniliformina *in vitro*. O presente estudo evidenciou que várias espécies ocorrem em associação com *Brachiaria* e *Panicum* e confirmou que essas gramíneas podem representar reservatório de importantes patógenos de grandes culturas como o milho. O modo de transmissão dessas espécies, sua frequência nas diversas hospedeiras e distribuição geográfica, assim como sua potencial contribuição na contaminação de gramíneas por micotoxinas ainda precisam ser avaliadas.

Palavras-chave: Endófitos. Filogenia molecular. Marcadores morfológicos. Micotoxinas.

ABSTRACT

Grasses of the genera *Brachiaria* and *Panicum* are used as forages, intercrops, and as cover plants in non-tillage systems. Many species of the genus *Fusarium* are associated with grasses as endophytes or pathogens, including some known mycotoxin producers. This study aimed to answer the questions: (i.) what *Fusarium* species are associated with forage grasses? (ii.) Can forage grasses be a reservoir of species pathogenic to important crops? (iii.) Are there mycotoxin producers among the *Fusarium* species found on *Brachiaria*? The specific objectives were (i.) to investigate the composition of *Fusarium* species in association with forage grasses from different regions of Brazil, using molecular phylogeny and morphological markers; (ii.) to verify the production of mycotoxins by the species found. The 63 isolates obtained from seeds, leaves and stems were identified as *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* and *F. chlamydosporum*, using phylogenetic analyses of partial *EF-1 α* and *RPB2* gene regions and morphological markers. *Fusarium mundagurra*, a recently described species from Australia, was found for the second time during this study. Other three new phylogenetic lineages were found within the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC), named *Fusarium* sp. 1, *Fusarium* sp. 2 and *Fusarium* "claudionori". All species and lineages of the FFSC analyzed, including *F. mundagurra*, *F. "claudionori"* and *Fusarium* sp. 1, produced fumonisins and moniliformin *in vitro*. *Brachiaria* and *Panicum* grasses commonly harbor several *Fusarium* species and may act as reservoirs of pathogens of important to crops like maize. The mode of transmission of those species, their frequency in different host plants, geographical distribution, and the risk they pose as mycotoxin producers need further evaluations.

Key words: Endophytes. Molecular phylogeny. Morphological markers. Mycotoxins.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	9
1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	9
2 ESTADO DA ARTE.....	11
2.1 Espécies de <i>Fusarium</i> associadas a gramíneas.....	11
2.2 Espécies de <i>Fusarium</i> associadas a gramíneas como produtoras de micotoxinas.....	12
REFERÊNCIAS	14
SEGUNDA PARTE - ARTIGO	17
ESPÉCIES DE <i>Fusarium</i> ASSOCIADAS A GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS.....	17

PRIMEIRA PARTE

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O gênero *Brachiaria* possui centro de origem no continente africano e foi introduzido no Brasil como forrageira entre as décadas de 50 e 60 pelo IPEAN, atual Embrapa (Valle, 1991; Serrão & Simão Neto, 1971). O gênero possui cerca de 100 espécies. No Brasil, foram encontradas 15 espécies deste gênero, destacando-se *B. brizantha* e *B. decumbens* (Soares Filho, 1994; Rodrigues, 2004). No Brasil, a área ocupada por pastagens é 172 milhões de hectares (IBGE, 2006). Além de seu uso como forrageira, a *Brachiaria* é utilizada em projetos de recuperação de áreas degradadas, na prevenção de processos erosivos, no consórcio com outras culturas e como palhada no plantio direto (Pereira, 2006; Timossi et al., 2007; Freitas et al., 2005; Souza et al., 2008). Frequentemente, é encontrada também como planta invasora (Pivello et al., 1999).

O gênero *Panicum* assim como a *Brachiaria*, tem com centro de origem a África. Este gênero possui cerca de mais de 500 espécies. A espécie de maior destaque *Panicum maximum* Jacq., ocupa aproximadamente 20% de toda a área de pastagens cultivadas no Brasil (Martuscello et al., 2007).

Os primeiros estudos que mencionam a relação de espécies de *Fusarium* com gramíneas nativas foram realizados na Austrália (Burgess & Summerell, 1992). Estes estudos demonstraram a existência de ampla gama de espécies como endófitos ou como patógenos latentes. *Fusarium gaditjirrii*, *F. beomiforme*, *F. babinda*, *F. aywerte* e *F. nurragi* foram descritos em associação com gramíneas nativas (Nelson et al., 1987; Summerell et al., 1995; Walsh et al., 2010). Isolados de *F. sacchari* foram identificados como associados com arroz selvagem na Austrália (Petrovic et al., 2013). Foi constatado a presença de *Fusarium fujikuroi*, agente causal da Bakanae em arroz, como endófito associado a *Echinochloa* (Carter et al., 2008). *Fusarium circinatum*, agente causal do cancro em pinus, foi encontrado associado com gramíneas nas proximidades de uma plantação de pinus, o que gerou a hipótese que essas gramíneas funcionavam como reservatório de inóculo (Swett & Gordon, 2012). Uma diversidade de espécies de *Fusarium* foi encontrada como endófitos em plantas de *Brachiaria* no Quênia, um dos centros de origem dessa gramínea (Kago et al., 2016). Várias espécies de *Fusarium* também foram encontradas em associação com *Panicum virgatum* no norte do estado de Oklahoma, nos EUA (Ghimire et al., 2011).

Vários estudos relacionam espécies de *Fusarium* e plantas de interesse agrônômico, no entanto, para as gramíneas nativas os estudos são escassos. As espécies *F. verticillioides*, *F.*

proliferatum, *F. andiyazi* e *F. thapsinum*, representantes do complexo *F. fujikuroi* e potencialmente produtoras de fumonisinas, foram encontradas em plantas assintomáticas de gramíneas nativas nos EUA (Leslie et al., 2004). Recentemente, *F. dactylidis* nova espécie produtora de nivalenol foi descrita associada a *Dactylis glomerata* (Aoki et al., 2015). *Fusarium armeniacum* foi encontrado em pastagens nativas destinadas a alimentação do gado na Argentina. Os isolados produzem altas concentrações de tricotecenos do tipo A, os quais representam uma ameaça potencial para a saúde animal (Nichea et al., 2015).

Este trabalho se propõe a responder às seguintes questões: (i.) Quais espécies de *Fusarium* estão associadas a gramíneas forrageiras? (ii.) As forrageiras podem se comportar como reservatório de espécies fitopatogênicas? (iii.) As espécies de *Fusarium* encontradas associadas a *Brachiaria* são produtoras de micotoxinas *in vitro*?

Os objetivos do presente trabalho foram averiguar as espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas forrageiras de diferentes regiões do Brasil usando filogenia molecular e caracterização morfológica e verificar a capacidade de produção de micotoxinas das espécies encontradas.

Esta dissertação está dividida em duas partes. A primeira apresenta o estado da arte, no qual são descritas espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas e seu potencial de produzir micotoxinas. A segunda parte é organizada como manuscrito de artigo científico, que relata estudo de espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas forrageiras e sua capacidade de produzir as micotoxinas fumonisinas e moniliformina.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas

Um dos estudos mais antigos que relatam a associação de *Fusarium* como endófitos ou como patógenos latentes em gramíneas foi realizado na Austrália por Burgess & Summerell (1992), onde uma ampla gama de espécies de *Fusarium* foi isolada, *F. chlamydosporum*, *F. compactum*, *F. equiseti*, *F. nygamai*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. napiforme*, *F. oxysporum*, *F. scirpi*, *F. semitectum*, *F. beomiforme* e *F. longipes*.

Em um trabalho sobre a incidência de espécies de *Fusarium* em inflorescências de gramíneas selvagens na província de Manitoba no Canadá, *Fusarium graminearum* foi a espécie predominante, em um total de sete espécies encontradas. Estes resultados indicam que as gramíneas silvestres abrigam várias espécies de *Fusarium*, incluindo *F. graminearum*, a espécie predominante que causa a fusariose no trigo em Manitoba (Inch & Gilbert, 2003).

Foi realizado um estudo sobre a distribuição e a diversidade de espécies de *Fusarium* associadas a dois grupos de gramíneas em 10 estados em toda a Península da Malásia, isto é, gramíneas agrícolas (*Oryza sativa* e *Saccharum officinarum*) e gramíneas não agrícolas, como espécies de *Panicum* e *Paspalum*, dentre outras. Um total de 474 isolados foram identificados por características morfológicas, *F. semitectum*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. compactum*, *F. chlamydosporum* e *F. longipes*. Este foi o primeiro relatório sobre a diversidade de *Fusarium* associado com gramíneas na Malásia (Nur Ain Izzati et al., 2009).

Fusarium konzum foi descrito a partir de isolamento de gramíneas nativas assintomáticas, principalmente de espécies de *Andropogon* encontradas nas pradarias do estado do Kansas (Zeller et al., 2003). *Fusarium gaditjirrii* foi descrito depois de ter sido isolado das gramíneas, *Heteropogon triticeus* e *Themeda triandra*, encontradas em savanas na Austrália (Phan et al., 2004). Duas novas espécies *F. lyarnte* e *F. werrikimbe* também foram descritas em associação com gramíneas tropicais no norte da Austrália (Walsh et al., 2010). Esses estudos têm levado ao reconhecimento de espécies anteriormente não descritas que parecem existir principalmente como endófitas.

Fusarium circinatum, agente causal de cancro em *Pinus*, foi isolado de duas espécies de gramíneas, *Holcus lanatus* e *Festuca arundinacea*, que se encontravam próximas a pinheiros. Esses isolados foram inoculados em mudas de pinheiros e induziram cancro. Estes resultados mostram que espécies de gramíneas podem ser hospedeiras assintomáticas de *F. circinatum*,

sendo o primeiro relato de *F. circinatum* em outra planta hospedeira fora da família Pinaceae (Swett & Gordon, 2012).

Isolados de *Fusarium sacchari*, agente etiológico da Pokkah boeng em cana-de-açúcar foram identificados como endófitos associados com arroz selvagem (*Oryza australienses*) na Austrália. Estes mesmos isolados foram patogênicos a milho, arroz e sorgo sendo uma ameaça para as gramíneas cultivadas no norte da Austrália (Petrovic et al., 2013). Foi constatado a presença de *Fusarium fujikuroi*, agente causal da Bakanae em arroz, como endófito associado a *Echinochloa*, espécie de gramínea aquática, essas plantas foram coletadas em áreas de cultivo de arroz (Carter et al., 2008).

Um total de 106 plantas pertencentes a 43 diferentes espécies de gramíneas foram coletadas de diferentes localidades da Hungria. Foram encontradas 11 espécies de *Fusarium* associadas as gramíneas. As espécies mais comuns, encontradas, foram *F. compactum*, *F. equiseti* e *F. graminearum*. Ainda foram obtidos isolados de *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. incarnatum*, *F. poae*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. venenatum* e *F. verticillioides*. Em todas as gramíneas forrageiras foram isoladas alguma espécie de *Fusarium* (Szécsi et al., 2013).

2.2 Espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas como produtoras de micotoxinas

As espécies *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. konzum*, *F. subglutinans*, potencialmente produtoras de fumonisinas, foram encontradas em plantas assintomáticas de gramíneas nativas do planalto norte-americano (Leslie et al., 2004). *Fusarium torulosum* foi isolado de folhas da gramínea kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) coletadas de uma pastagem perto de Maitland, em que o gado de pastagens foi afetado pelo envenenamento por kikuyu. Este fungo é conhecido por produzir as toxinas wortmannin e butenolida, ambos os quais podem produzir sinais clínicos e alterações patológicas semelhantes aos exibidos pelo gado com envenenamento kikuyu. As evidências disponíveis sugerem que *F. torulosum* pode ser o agente casual da intoxicação por kikuyu na Austrália (Ryley et al., 2007). Outras espécies de *Fusarium* foram isoladas de *Pennisetum clandestinum* coletadas durante surtos de intoxicação por kikuyu em bovinos na África do Sul, Esses isolados eram predominantemente membros do FIESC, dentre eles *F. equiseti* (Botha et al., 2014). Entretanto, a possibilidade de que o envenenamento do kikuyu seja uma micotoxicose não foi investigada mais a fundo nesses trabalhos.

Recentemente nos EUA e na Nova Zelândia, *Fusarium dactylidis* nova espécie produtora de nivalenol foi descrita associada a *Dactylis glomerata*. *F. dactylidis* produziu além de nivalenol, quantidades baixas, mas detectáveis da micotoxina zearalenona (Aoki et al.,

2015). *Fusarium armeniacum* foi encontrado em pastagens nativas destinadas a alimentação do gado na província de Chaco, Argentina. Os isolados produzem altas concentrações de tricotecenos do tipo A, os quais representam uma ameaça potencial para a saúde animal, *F. armeniacum* é comumente associado com gramíneas naturais na Argentina. Algumas micotoxinas em concentrações menores, tais como BEA (beauvericina) e AUF (aurofusarim), também foram produzidas. Alguns isolados também foram capazes de produzir ZEA (Nichea et al., 2015).

A produção de micotoxinas por espécies de *Fusarium* isoladas de gramas nativas da Malásia foi avaliada em um trabalho onde 12 espécies diferentes de *Fusarium* foram encontradas, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. semitectum*, *F. nelsonii*, *F. compactum*, *F. equiseti*, *F. chlamydosporum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. sacchari*, *F. lateritium* e espécies do complexo *F. incarnatum-equiseti*. Foi analisado por meio de TLC e HPLC o perfil para quatro micotoxinas: moniliformina (MON), fumonisina B1 (FB1), zearalenona (ZEN) e beauvericina (BEA). Onde BEA foi a toxina de maior ocorrência, seguida de MON, ZEN e FB1. Pela primeira vez foi relatada a produção de BEA por *F. solani*, *F. compactum* e *F. chlamydosporum*. *Fusarium nelsonii* e *F. lateritium* não produziram nenhuma micotoxina (Nor Azliza et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- Aoki T, Vaughan MM, McCormick SP, Busman M, Ward TJ, Kelly A, O'Donnell K, Johnston PR, Geiser DM (2015) *Fusarium dactylidis* sp. nov., a novel nivalenol toxin-producing species sister to *F. pseudograminearum* isolated from orchard grass (*Dactylis glomerata*) in Oregon and New Zealand. *Mycologia* 107:409-418.
- Botha CJ, Truter M, Jacobs A (2014) *Fusarium* species isolated from *Pennisetum clandestinum* collected during outbreaks of kikuyu poisoning in cattle in South Africa: research communication. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 81:1-8.
- Burgess LW, Summerell BA (1992) Mycogeography of *Fusarium*. Survey of *Fusarium* species from subtropical and semi-arid grassland soil from Queensland, Australia. *Mycological Research* 96:780-784.
- Carter LLA, Leslie JF, Webster RK (2008) Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and water grass. *Phytopathology* 98:992-998.
- Freitas FCL, Ferreira LR, Ferreira FA, Santos MV, Agnes EL, Cardoso AA, Jakelaitis A (2005) Formação de pastagem via consórcio de *Brachiaria brizantha* com o milho para silagem no sistema de plantio direto. *Revista Planta Daninha* 23:49-58.
- Ghimire SR, Charlton ND, Bell JD, Krishnamurthy YL, Craven KD (2011) Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. *Fungal Diversity* 47:19-27.
- IBGE (2006) Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Rio de Janeiro. IBGE.
- Inch S, Gilbert J (2003) The incidence of *Fusarium* species recovered from inflorescences of wild grasses in southern Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25:379-383.
- Kago L, Njuguna J, Njarui DMG, Ghimire SR (2016) Fungal endophyte communities of *Brachiaria* grass (*Brachiaria* spp.) in Kenya. Climate Smart *Brachiaria* grasses for Improving Livestock Production in East Africa–Kenya Experience. In: Proceedings of the workshop held in Naivasha, Nairobi, Kenya. p.150-162.
- Leslie JF, Zeller KU, Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Ritiene A (2004) Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2254-2262.
- Nelson PE, Toussoun TA, Burgess LW (1987) Characterization of *Fusarium beomiforme* sp. nov. *Mycologia* 79:889-889.
- Nichea MJ, Cendoya E, Zchetti VGL, Chiacchiera SM, Sulyok M, Krska R, Ramirez M L (2015) Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed. *World Mycotoxin Journal* 8:451-457.

Nor Azliza I, Hafizi R, Nurhazrati M, Salleh B (2014) Production of major mycotoxins by *Fusarium* species isolated from wild grasses in Peninsular Malaysia. *Sains Malaysiana* 43:89-94.

Nur Ain Izzati MZ, Siti Nordahliawate MS, Nor Azliza I, Salleh B (2009) Distribution and diversity of *Fusarium* spp. associated with grasses in ten states throughout Peninsular Malaysia. *Biotropia* 16:55-64.

Martuscello JA (2007) Repetibilidade de caracteres agronômicos em *Panicum maximum* Jacq. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36:1975-1981.

Patiño B, Mirete S, González-Jaén MT, Mulé G, Rodríguez MT, Vázquez C (2004) PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection* 67:1278-1283.

Pereira AR (2006) Como selecionar plantas para áreas degradadas e controle de erosão. Belo Horizonte: FAPI. 96p.

Petrovic T, Burgess LW, Cowie I, Warren RA, Harvey PR (2013) Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize. *European Journal Plant Pathology* 136:773-788.

Phan HT, Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Liew EC, Smith-White JL, Clarkson JR (2004) *Gibberella gaditjirrii* (*Fusarium gaditjirrii*) sp. nov., a new species from tropical grasses in Australia. *Studies in Mycology* 50:261-272.

Pivello VR, Shida CN, Meirelles ST (1999) Alien grasses in Brazilian savannas: a threat to biodiversity. *Biodiversity & Conservation* 8:1281-1294.

Rodrigues DC (2004). Produção de forragem de cultivares de *Brachiaria brizantha* (Host. ex A. Rich.) Stapf e Modelagem de respostas produtivas em função de variáveis climáticas. Piracicaba. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 94p.

Ryley MJ, Bourke CA, Liew ECY, Summerell BA (2007). Is *Fusarium torulosum* the causal agent of kikuyu poisoning in Australia? *Australasian Plant Disease Notes* 2:133-135.

Serrão EAS, Simão Neto M (1971) Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evrard. Belém: Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN). Estudos sobre forrageiras na Amazônia, vol. 2, n. 1, 31p.

Soares Filho CV (1994) Recomendações de espécies e variedades de *Brachiaria* para diferentes condições. In: Simpósio sobre Manejo de Pastagens, 11., 1994, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 325 p.

Souza ED, Costa SEVGA, Lima CVS, Anghinoni I, Meurer EJ, Carvalho PCF (2008) Carbono orgânico e fósforo microbiano em sistema de integração agricultura-pecuária submetido a

diferentes intensidades de pastejo em plantio direto. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 32:1273-1282.

Summerell BA, Rugg CA, Burgess LW (1995) Characterization of *Fusarium babinda* sp. nov. *Mycological Research* 99:1345-1348.

Swett CL, Gordon TR (2012) First report of grass species (*Poaceae*) as naturally occurring hosts of the pine pathogen *Gibberella circinata*. *Plant Disease* 96:908-908.

Szécsi Á, Magyar D, Tóth S, Szőke C (2013) Poaceae: a rich source of endophytic fusaria. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 48:19-32.

Timossi PC, Durigan JC, Leite GJ (2007) Formação de palhada por braquiárias para adoção do sistema plantio direto. *Bragantia* 66:617-622.

Valle CB (1991). Avaliação de Germoplasma e Melhoramento Genético de Braquiárias. In: Paulino V. T. et al. In: Encontro para discussão sobre capins do gênero Brachiaria. Anais. Nova Odessa, Instituto de Zootecnia 301-342.

Valle CB, Jank L, Resende RMS (2009) O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Revista Ceres* 56:460-472.

Walsh JL, Laurence MH, Liew ECY, Sagalang AE, Burgess LW, Summerell BA, Petrovic T. (2010) *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity* 44:149-159.

Zeller KA, Summerell BA, Bullock S, Leslie JF (2003) *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 95:943-954.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO**ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS**

Filipe S. do Carmo^a, Maruzanete P. Melo^b, Ludwig H. Pfenning^a

^aDepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa postal 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brasil.

^bDepartamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina, PI, Brasil.

Manuscrito preparado para submissão à revista Tropical Plant Pathology

RESUMO

Gramíneas do gênero *Brachiaria* e *Panicum* são utilizadas não somente como forrageiras, mas também em consórcio com outras culturas e como palhada no plantio direto. Diversas espécies de *Fusarium* são encontradas em associação a gramíneas como endófitos ou patógenos. Algumas dessas espécies são conhecidas por seu potencial de produzir micotoxinas. Este trabalho se propõe a responder às seguintes questões: (i.) quais espécies de *Fusarium* estão associadas a gramíneas forrageiras? (ii.) as forrageiras podem ser reservatório de espécies patogênicas a outras plantas? (iii.) as possíveis novas linhagens associadas a *Brachiaria* são potenciais produtoras de micotoxinas? Os objetivos foram (i.) averiguar quais espécies de *Fusarium* ocorrem em associação com gramíneas forrageiras dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* de diferentes regiões do Brasil, usando filogenia molecular e caracterização morfológica e (ii.) verificar a capacidade de produção de micotoxinas das espécies encontradas. Os 63 isolados obtidos de sementes, folhas e colmos foram identificados por meio de análise filogenética das regiões gênicas *EF-1 α* e *RPB2*, e avaliação dos marcadores morfológicos como *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* e *F. chlamydosporum*. A espécie *F. mundagurra*, recentemente descrita na Austrália, tem nesse estudo o seu segundo registro. Foram encontradas ainda mais três novas linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC), denominadas como *Fusarium* sp. 1, *Fusarium* sp. 2 e *Fusarium* “*claudionori*”. Todas as espécies e linhagens do FFSC analisadas, inclusive *F. mundagurra*, *F. “claudionori”* e *Fusarium* sp. 1, produziram as micotoxinas fumonisinas e moniliformina *in vitro*. O presente estudo evidenciou que várias espécies ocorrem em associação com *Brachiaria* e *Panicum* e confirmou que essas gramíneas podem representar reservatório de importantes patógenos de grandes culturas como o milho. O modo de transmissão dessas espécies, sua frequência nas diversas hospedeiras e distribuição geográfica, assim como sua potencial contribuição na contaminação de gramíneas por micotoxinas ainda precisam ser avaliadas.

Palavras-chave: Endófitos. Filogenia molecular. Marcadores morfológicos. Micotoxinas.

ABSTRACT

Grasses of the genera *Brachiaria* and *Panicum* are used as forages, intercrops, and as cover plants in non-tillage systems. Many species of the genus *Fusarium* are associated with grasses as endophytes or pathogens, including some known mycotoxin producers. This study aimed to answer the questions: (i.) what *Fusarium* species are associated with forage grasses? (ii.) Can forage grasses be a reservoir of species pathogenic to important crops? (iii.) Are there mycotoxin producers among the *Fusarium* species found on *Brachiaria*? The specific objectives were (i.) to investigate the composition of *Fusarium* species in association with forage grasses from different regions of Brazil, using molecular phylogeny and morphological markers; (ii.) to verify the production of mycotoxins by the species found. The 63 isolates obtained from seeds, leaves and stems were identified as *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* and *F. chlamydosporum*, using phylogenetic analyses of partial *EF-1 α* and *RPB2* gene regions and morphological markers. *Fusarium mundagurra*, a recently described species from Australia, was found for the second time during this study. Other three new phylogenetic lineages were found within the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC), named *Fusarium* sp. 1, *Fusarium* sp. 2 and *Fusarium* “*claudionori*”. All species and lineages of the FFSC analyzed, including *F. mundagurra*, *F. “claudionori”* and *Fusarium* sp. 1, produced fumonisins and moniliformin *in vitro*. *Brachiaria* and *Panicum* grasses commonly harbor several *Fusarium* species and may act as reservoirs of pathogens of important to crops like maize. The mode of transmission of those species, their frequency in different host plants, geographical distribution, and the risk they pose as mycotoxin producers need further evaluations.

Key words: Endophytes. Molecular phylogeny. Morphological markers. Mycotoxins.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Brachiaria* possui centro de origem no continente africano e foi introduzido no Brasil como forrageira entre as décadas de 50 e 60 pelo IPEAN, atual Embrapa (Serrão & Simão Neto, 1971; Valle, 1991; Valle et al., 2009). O gênero possui cerca de 100 espécies. No Brasil, foram encontradas 15 espécies deste gênero, destacando-se *B. brizantha* e *B. decumbens* (Soares Filho, 1994; Rodrigues, 2004). No Brasil, a área ocupada por pastagens é 172 milhões de hectares (IBGE, 2006). Além de seu uso como forrageira, a *Brachiaria* é utilizada em projetos de recuperação de áreas degradadas, na prevenção de processos erosivos, no consórcio com outras culturas e como palhada no plantio direto (Freitas et al., 2005; Pereira, 2006; Timossi et al., 2007; Souza et al., 2008). Frequentemente, é encontrada também como planta invasora (Pivello et al., 1999).

O gênero *Panicum* assim como a *Brachiaria*, tem com centro de origem a África. Este gênero possui cerca de mais de 500 espécies. A espécie de maior destaque *Panicum maximum* Jacq., ocupa aproximadamente 20% de toda a área de pastagens cultivadas no Brasil (Martuscello et al., 2007).

Os primeiros estudos que mencionam a relação de espécies de *Fusarium* com gramíneas nativas foram realizados na Austrália (Burgess & Summerell, 1992). Estes estudos demonstraram a existência de ampla gama de espécies como endófitos ou como patógenos latentes. *Fusarium gaditjirrii*, *F. beomiforme*, *F. babinda*, *F. aywerte* e *F. nurragi* foram descritos em associação com gramíneas nativas (Nelson et al., 1987; Summerell et al., 1995; Walsh et al., 2010). Isolados de *F. sacchari* foram identificados como associados com arroz selvagem na Austrália (Petrovic et al., 2013). Foi constatado a presença de *Fusarium fujikuroi*, agente causal da Bakanae em arroz, como endófito associado a *Echinochloa* (Carter et al., 2008). *Fusarium circinatum* agente causal do cancro em pinus, foi encontrado associado com gramíneas, que se encontravam próximas a uma plantação de pinus, essas gramíneas funcionavam como reservatório de inoculo (Swett & Gordon, 2012). Uma diversidade de espécies de *Fusarium* foi encontrada endofiticamente em plantas de *Brachiaria* no Quênia, um dos centros de origem dessa gramínea (Kago et al., 2016) e uma grande quantidade de espécies de *Fusarium* também foi encontrada associada a *Panicum virgatum* L no norte do estado de Oklahoma, nos EUA (Ghimire et al., 2011).

Vários estudos relacionam espécies de *Fusarium* e plantas de interesse agrônômico, no entanto, para as gramíneas nativas ou invasoras os estudos são escassos. As espécies *F.*

verticillioides, *F. proliferatum*, *F. andiyazi* e *F. thapsinum*, representantes do complexo *F. fujikuroi* e potencialmente produtoras de fumonisinas, foram encontradas em plantas assintomáticas de gramíneas nativas nos EUA (Leslie et al., 2004). Recentemente, *F. dactylidis* nova espécie produtora de nivalenol foi descrita associada a *Dactylis glomerata* (Aoki et al., 2015). *Fusarium armeniacum* foi encontrado em pastagens nativas destinadas a alimentação do gado na Argentina. Os isolados produzem altas concentrações de tricotecenos do tipo A, os quais representam uma ameaça potencial para a saúde animal (Nichea et al., 2015).

Este trabalho se propõe a responder às seguintes questões: (i.) Quais espécies de *Fusarium* estão associadas a gramíneas forrageiras? (ii.) As forrageiras podem se comportar como reservatório de espécies fitopatogênicas? (iii.) As espécies de *Fusarium* encontradas associadas a *Brachiaria* são produtoras de micotoxinas *in vitro*? Os objetivos do presente trabalho foram averiguar as espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas forrageiras de diferentes regiões do Brasil usando filogenia molecular e caracterização morfológica e verificar a capacidade de produção de micotoxinas das espécies encontradas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de isolados

Foi composta uma coleção de 63 isolados de *Fusarium* de espécies de *Brachiaria decumbens* cv. Basiliske, *B. brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. Toledo, obtidos de folhas, sementes e colmos das plantas colhidas em pastagens aparentemente saudáveis. Culturas monospóricas dos isolados obtidos foram preservadas e armazenadas na Coleção Micológica de Lavras (CML).

2.2 Extração de DNA, PCR e análises filogenéticas

Os fungos foram cultivados em meio líquido à base de extrato de malte 2% por três dias em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com o uso do kit de extração Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega), São Paulo, BR). O DNA extraído teve sua concentração determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

A amplificação do fragmento do gene que codifica o fator de alongação-1 α (*EF-1 α*) dos isolados foi realizada utilizando os primers Ef - 1 (forward; 5-

ATGGGTAAGGAGGACAAGAC - 3) e Ef - 2 (reverse; 5-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3) (O'Donnell et al., 1998). Para a amplificação do fragmento da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (Rpb2) foram utilizados os *primers* 5F2 (forward; 5- GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3) e 7cR (reverse; 5 CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3) (O'Donnell et al., 2009). As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler TM (BIO-RAD). As condições de ciclo para *EF-1 α* foram as seguintes condições: 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94°C, por 30 segundos, 62°C, por 45 segundos, 72°C, por 1 minuto; 72°C, por 5 minutos (O'Donnell et al., 1998). Para *RPB2*, o programa de ciclos foi: 94°C por 90 segundos; 40 ciclos: 94°C por 30 segundos, 55°C por 90 segundos, 68°C por 2 minutos; 68°C por 5 minutos (O'Donnell et al., 2009). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em transluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil, São Paulo, BR) e preparados para sequenciamento.

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa MacroGen EUA. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente no programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Alemanha) (Hepperle, 2011) e as sequências editadas foram comparadas na base de dados GenBank, National Center for Biotechnological Information - NCBI, por meio da ferramenta BLAST.

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos dos isolados foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementada pelo programa MEGA 5. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima parcimônia por meio do programa MEGA 6 (Tamura et al., 2011). Sequências de referência tipo das regiões *EF-1 α* e *RPB2* de espécies do FFSC e do FGCS, disponíveis no GenBank, foram incluídas nas análises (Tabela 2). Sequências de *F. oxysporum* (NRRL 22902), *F. inflexum* (NRRL 20433) e *F. concolor* (NRRL 13459) foram utilizadas para formar os grupos externos.

2.3 Caracterização morfológica

Os isolados obtidos foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) e incubados a 25°C no escuro por 4 dias para observação da taxa de crescimento e por 14 dias para a avaliação da coloração da colônia. As características micromorfológicas como a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides; presença ou não de clamidósporos presença ou não de microconídios em falsas cabeças e presença ou não de hifa estéril espiralada, foram avaliadas em Synthetic Nutrient-poor Agar (SNA) + folha de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). Os isolados foram incubados a 20°C sob fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente e após 10 a 14 dias de incubação foi feita a avaliação (Leslie & Summerell, 2006). Foram realizadas três repetições por isolado.

2.4 Análise de micotoxinas dos isolados

Avaliação da produção de fumonisinas (FB1, FB2) e moniliformina de doze isolados de diferentes espécies de *Fusarium* foi determinada pelo crescimento dos isolados em canjiquinha de milho. Frascos Erlenmeyer contendo 50 g de canjiquinha de milho e 20 ml de água destilada, foram autoclavados duas vezes por 30 min a 121°C. Após o resfriamento, o milho foi inoculado com discos de ágar coletados a partir da margem das colônias de cada isolado com 7 dias crescidos em SNA que foram incubados a 25 °C por 28 dias. Após a incubação, o material da cultura foi seco em estufa de ventilação forçada a 60 °C por 48 h e finalmente moído e armazenado a 4°C até o uso. Os controles foram tratados da mesma maneira, exceto que eles não foram inoculados.

A análise de fumonisinas (FB1 e FB2) foi baseada no método de Shephard et al. (1990) modificado por Doko et al. (1995), no qual 15 g da amostra moída foi misturada com 50 mL de metanol:água (3:1) por 30 min e filtrado através de papel filtro Whatman N°4 para extrair a toxina. Aliquotas dos extratos foram purificadas usando cartuchos SAX (solid-phase strong anion-exchange). Os cartuchos foram lavados para remover substâncias interferentes potenciais, e as fumonisinas foram seletivamente eluídas. Uma alíquota do eluído (50 µL) foi derivatizada com 200 µL de solução de orto-ftaldialdeído (OPA) (obtida pela adição de 5 mL de tetraborato de sódio 0.1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol para 1 mL de metanol contendo 40 mg de OPA).

Os derivados de fumonisina foram analisados usando HPLC de fase reversa acoplado com um sistema de detecção fluorescente. Para a fase móvel foi usado metanol 01 M, dihidrogenofosfato de sódio (75:25) solução ajustada para pH 3.35 com ácido ortofosfórico a uma taxa de fluxo de 1.5 mL/min. A fluorescência dos derivados de fumonisina foi registrada a excitação e emissão do comprimento de onda de 335 e 440 nm, respectivamente. As fumonisinas foram medidas com a altura dos picos e comparada com soluções dos padrões de referência de FB1 e FB2 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA). Para a curva de calibração, quatro soluções foram preparadas (0.25, 0.5, 1.0 e 2.0 µg/mL) pela diluição de uma alíquota da solução estoque de fumonisinas (50 µg/mL cada) com o volume apropriado de acetonitrila: água (1:1, v/v). Os tempos de retenção da FB1 e FB2 foram 7.5 e 16.7 min, respectivamente. O limite de detecção do método analítico para as duas fumonisinas foi 1 µg/g.

A análise de moniliformina foi baseada no método de Parich et al. (2003) com pequenas modificações. Misturou-se 10 g da amostra moída com 50 mL de acetonitrila: água (84:16) por 60 min e em seguida foi filtrado através de papel filtro Whatman N°4. Alíquotas de 5 mL dos extratos foram purificadas com colunas de imunoafinidade MycoSep®240 MON (Romer Labs®) de acordo com as recomendações do fabricante. Então, 100 µL de cada extrato foram totalmente evaporados sob uma corrente de gás nitrogênio e temperatura (< 40 °C). O extrato evaporado foi redissolvido com 100 µL da solução de fase móvel.

A análise foi realizada usando HPLC de fase reversa com detector UV a 228 nm. A separação foi realizada com coluna C18 (150 x 2.1 mm, 5 µm) usando como fase móvel um tampão de par iônico (10 mL de solução de par iônico e 50 mL de acetonitrila foram diluídos com água para 1000 mL) a um fluxo de 1 mL/min, e o tempo de retenção da MON nessas condições foi 6.5 min. As concentrações de MON foram medidas como o comprimento dos picos e comparadas com soluções padrão de referência. Para a curva de calibração, soluções de diferentes concentrações foram preparadas pela diluição de uma alíquota da solução estoque de MON com volume apropriado de fase móvel. O limite de detecção para esse método analítico foi 1 µg/g.

3 RESULTADOS

3.1 Obtenção de isolados

Foram obtidos 63 isolados provenientes de *Brachiaria* e *Panicum*. Os isolados representam os complexos de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC), *Fusarium chlamydosporum* (FCSC), *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium graminearum* (FGSC) (Tabela 1).

Foram utilizados isolados de referência do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) e do Complexo de Espécies *Fusarium chlamydosporum* (FCSC) para obtenção das árvores filogenéticas (Tabela 2 anexo).

Tabela 1. Isolados de *Fusarium* provenientes de gramíneas forrageiras de diferentes regiões geográficas do Brasil (continua).

CML ^a	Outro código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isol.	Tef	Rpb2
3032	^b MP 192	<i>Fusarium</i> sp. 1	<i>B. decumbens</i>	Campo Grande, MS	2012	X	X
3163	MP 193	<i>Fusarium</i> sp. 1	<i>B. decumbens</i>	Campo Grande, MS	2012	X	X
3657	^c FS 41	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>B. brizantha</i>	Guaira, SP	2016	X	
3658	FS 42	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>B. brizantha</i>	Guaira, SP	2016	X	X
3659	FS 46	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>B. brizantha</i>	Guaira, SP	2016	X	X
3660	FS 48	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>B. brizantha</i>	Guaira, SP	2016	X	
3037	MP 303	<i>F. mundagurra</i>	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2012	X	X
3056	MP 304	<i>F. mundagurra</i>	<i>B. decumbens</i>	Campo Grande, MS	2012	X	X
3049	MP 375	<i>F. mundagurra</i>	<i>B. decumbens</i>	Rondonópolis, MT	2012	X	X
3662	MP 383	<i>F. mundagurra</i>	<i>B. ruziensis</i>	Auriflama SP	2013	X	
3661	FS 47	<i>F. mundagurra</i>	<i>B. brizantha</i>	Guaira, SP	2016	X	
3040	MP 311	<i>F. claudionori</i>	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2013	X	X
3041	MP 312	<i>F. claudionori</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2012	X	
3044	MP 320	<i>F. claudionori</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	X	
3656	FS 03	<i>F. claudionori</i>	<i>B. brizantha</i>	Porto Alegre, RS	2016	X	X
3035	MP 300	<i>F. fujikuroi</i>	<i>B. brizantha</i>	Campo Grande, MS	2012	X	
3036	MP 302	<i>F. proliferatum</i>	<i>B. brizantha</i>	Campo Grande, MS	2012	X	
3038	MP 306	<i>F. proliferatum</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	X	
3052	MP 382	<i>F. proliferatum</i>	<i>B. decumbens</i>	Agua Clara, MS	2013	X	
3039	MP 309	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	X	
3164	MP 310	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. brizantha</i>	Campo Grande, MS	2013	X	
3045	MP 323	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2012	X	
3046	MP 324	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	X	
3047	MP 325	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. brizantha</i>	Rondonópolis, MT	2013	X	
3033	MP 195	<i>F. verticillioides</i>	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2012	X	
3043	MP 318	<i>F. verticillioides</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2012	X	
3663	MP 314	<i>F. verticillioides</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	X	
3664	MP 322	<i>F. verticillioides</i>	<i>B. decumbens</i>	Rondonópolis, MT	2013	X	
	FS 05	<i>F. equiseti</i>	<i>B. brizantha</i>	Rondonópolis, MT	2016		
	FS 06	<i>F. equiseti</i>	<i>B. brizantha</i>	Rondonópolis, MT	2016		
3636	FS 07	<i>F. equiseti</i>	<i>B. brizantha</i>	Rondonópolis, MT	2016		
	FS 08	<i>F. equiseti</i>	<i>B. brizantha</i>	Rondonópolis, MT	2016		
	FS 23	<i>F. equiseti</i>	<i>B. decumbens</i>	Rondonópolis, MT	2016		
	FS 24	<i>F. equiseti</i>	<i>B. brizantha</i>	Rondonópolis, MT	2016		
	FS 25	<i>F. equiseti</i>	<i>B. brizantha</i>	Rondonópolis, MT	2016		
	FS 15	<i>F. equiseti</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
3665	FS 30	<i>F. chlamyosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016	X	

	FS 31	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
3666	FS 32	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016	X	
	FS 33	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 34	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 35	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 36	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
3667	FS 38	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016	X	
	FS 39	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 37	<i>F. graminearum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 02	<i>F. semitectum</i>	<i>B. brizantha</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 04	<i>F. semitectum</i>	<i>B. brizantha</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 09	<i>F. semitectum</i>	<i>B. brizantha</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 21	<i>F. semitectum</i>	<i>B. brizantha</i>	Goiânia, GO	2016		
	FS 22	<i>F. semitectum</i>	<i>B. brizantha</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 10	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 11	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 12	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 13	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 14	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 16	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 17	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 18	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 19	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 20	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		
	FS 40	<i>F. semitectum</i>	<i>P. maximum</i>	Porto Alegre, RS	2016		

^aCML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. Código pessoal para isolados obtidos nesse estudo ^bMP: Maruzanete Pereira de Melo. ^cFS: Filipe Sandin. ^eEF-1 α : Fator de alongação 1- α ; ^dRpb2: Segunda maior subunidade da RNA polimerase.

3.2 Análise Filogenética

Na análise de sequências parciais do gene *EF-1 α* pelo método de Máxima Parcimônia, 29 isolados agruparam em sete clados distintos do Complexo de Espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (Figura 6 anexo). Cinco isolados se agruparam junto ao isolado de referência de *verticillioides*, seis isolados junto ao de referência de *F. thapsinum*, três isolados junto ao de referência de *F. proliferatum* e um isolado junto ao de referência de *F. fujikuroi*. Um clado composto por quatro isolados agrupou-se com o isolado da linhagem *F. "claudionori"*, formando um grupo irmão com *F. andiyazi*. Dois isolados formaram uma linhagem separada, denominada de *Fusarium* sp. 1. Nove isolados formaram uma linhagem irmã de *F. mundagurra*.

Com base no agrupamento gerado pela região *EF-1 α* , um grupo de 9 isolados foi escolhido para obter sequências de *RPB2* (Figura 7 - anexo) e gerar a árvore combinada. Na árvore gerada formaram-se quatro clados distintos (Figura 1). Três isolados se agruparam junto ao isolado de referência de *F. mundagurra*. Um clado foi composto por dois isolados, que se agruparam com o isolado da linhagem *F. "claudionori"*, formando um grupo irmão com *F. andiyazi*. Dois isolados formaram um clado irmão com *F. nygamai*, *Fusarium* sp. 1. Dois isolados formaram uma clado irmão de *F. mundagurra*, denominado linhagem *Fusarium* sp. 2. Uma árvore foi gerada a pelo método de Máxima Parcimônia a partir de sequências parciais do gene *EF-1 α* , com 3 isolados obtidos se agrupando com isolados de referência do Complexo Espécies *Fusarium chlamydosporum* (FCSC) (Figura 8 - anexo).

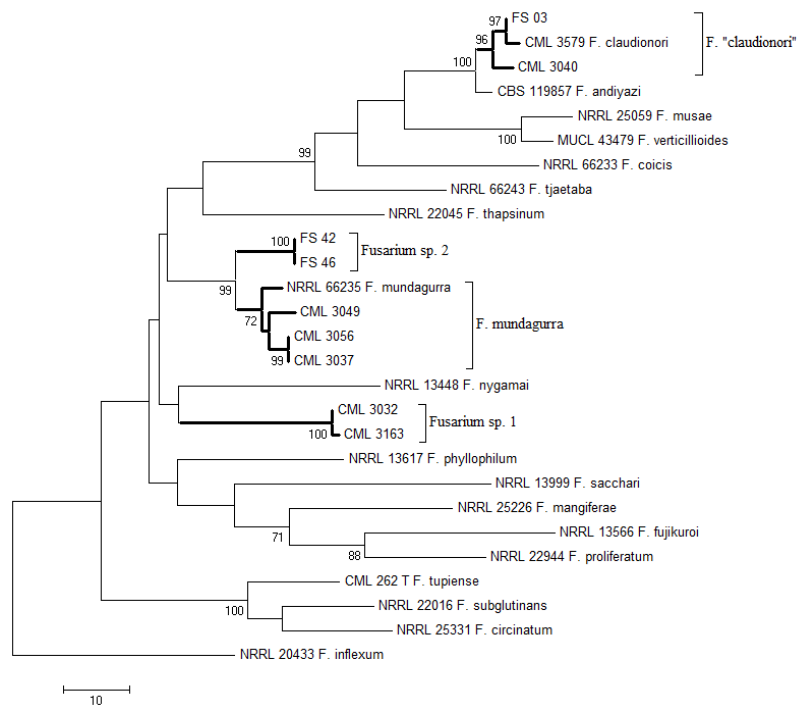


Figura 1 Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de sequências combinadas dos genes *EF-1α* e *RPB2* de isolados de *Fusarium* obtidos nesse trabalho e isolados de referência pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado 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; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; MUCL: Mycotheque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Bélgica; NRRL: Northern Regional Research Laboratory, Peoria IL, EUA.

3.3 Caracterização morfológica

A morfologia das espécies conhecidas, *F. chlamyosporum*, *F. equiseti*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides* foi de acordo com os marcadores descritos na literatura (Leslie & Summerell, 2006). Os isolados apresentaram microconídios formados em cadeias longas, cadeias curtas e em falsas cabeças. Os macroconídios apresentaram 3-5 septos, produzidos a partir de esporodóquio de coloração alaranjada em SNA. Em BDA as culturas apresentaram coloração violeta, salmão, alaranjada e alguns sem pigmentação. Os isolados de *F. mundagurra* também apresentaram morfologia de acordo com os marcadores descritos na literatura (Figura 2) (Laurence et al., 2015).

A linhagem *F. "claudionori"* (Figura 3) apresenta microconídios produzidos a partir monofiálides longas, em cadeia variando de média a longa, variam de formato de clavado para ovoide, medindo de 5-14 x 1,8-5 μm e apresentam de 0-1 septos. Os macroconídios apresentaram tamanho variado de 22-45 x 2,5-5 μm , com a 3-5 septos. Foi observada a presença de pseudoclamidósporos. A linhagem *F. "claudionori"* compartilha os mesmos marcadores morfológicos de *F. andiyazi*.

A linhagem filogenética denominada *Fusarium* sp. 1 (Figura 4) apresenta microconídios de formato ovoide a clavado, medindo de 5-14 x 1,8-4 , de 0-1 septos, sendo a maioria sem septos, produzidos em falsas cabeças em polifiálides. A presença de clamidósporos em cadeias, grupos ou nas extremidades de hifas foi observada. Os macroconídios apresentam 3-5 septos, medindo 32,5-52,5 x 2-4 μm .

Já linhagem filogenética *Fusarium* sp. 2 (Figura 5) apresenta microconídios de formato ovoide a clavado, medindo de 5-15 x 2-5 μm , com 0-1 septos, sendo a maioria sem septos, produzidos a partir monofiálides e polifiálides, em cadeias curtas. Macroconídios apresentam 3-5 septos, medindo 23,5-55 x 2-5 μm . Foi observada a produção de clamidósporos.

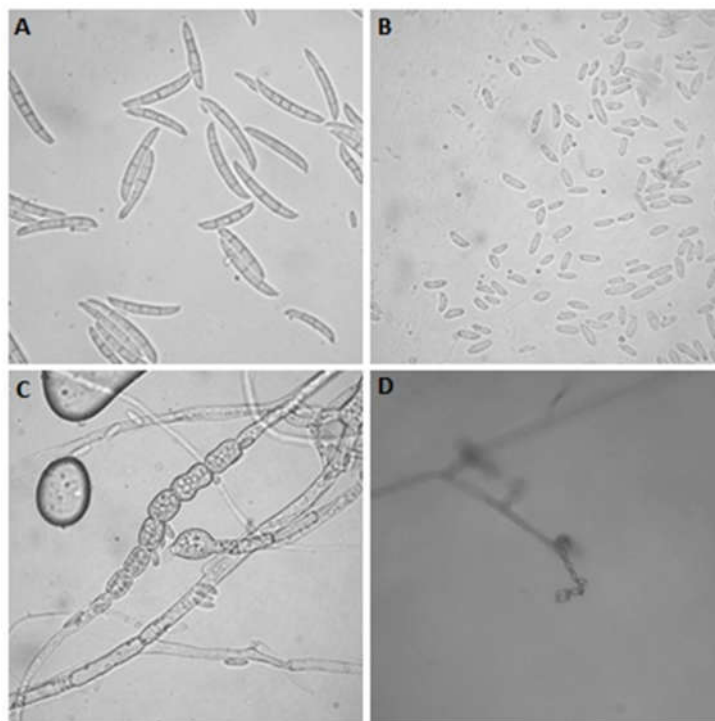


Figura 2 *Fusarium mundagurra*: A. Macroconídios, B. Microconídios, C. Clamidósporos em cadeia, D. Microconídios em cadeia curta.

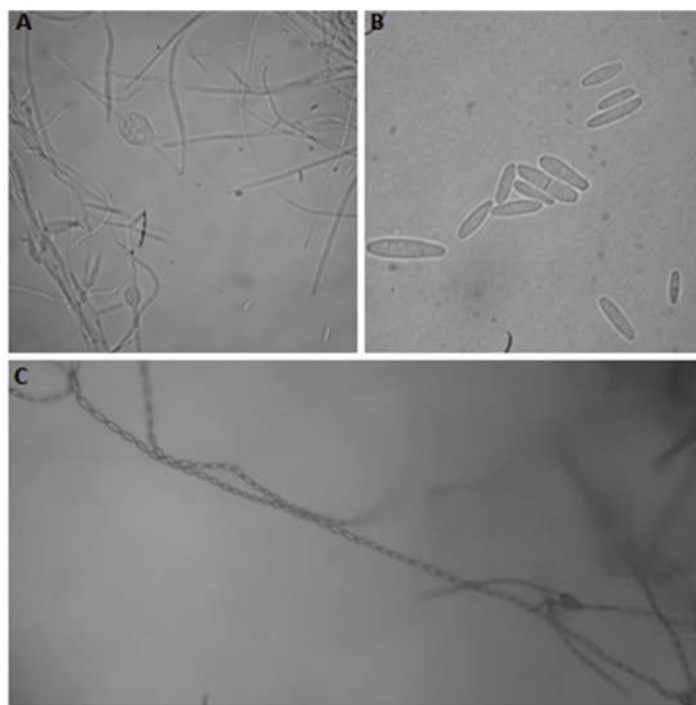


Figura 3 *Fusarium "claudionori"*: A. Pseudoclamidósporos, B. Microconídios, C. Microconídios em cadeia longa.

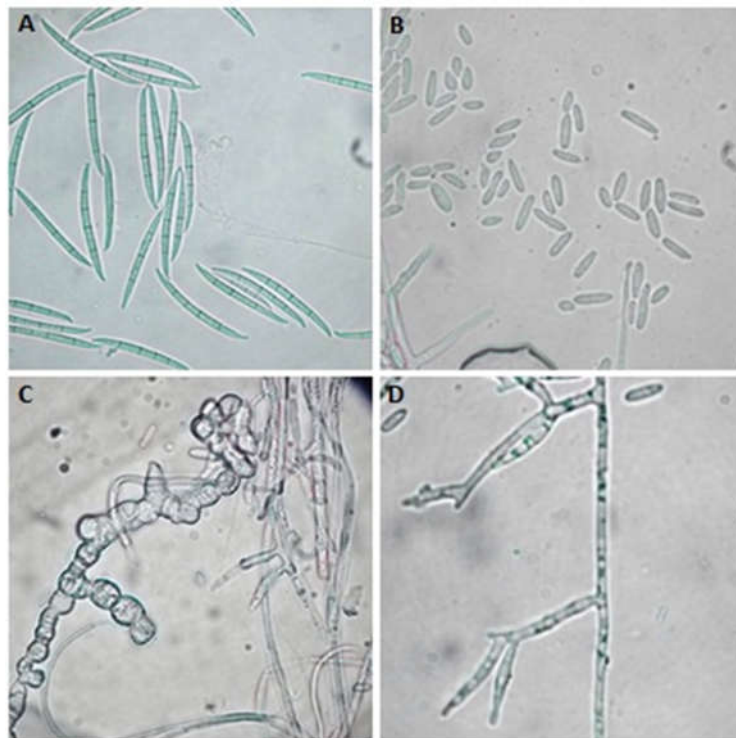


Figura 4 *Fusarium* sp.1: A. Macroconídios, B. Microconídios, C. Clamidósporos em cadeia, D. Polifíalides.

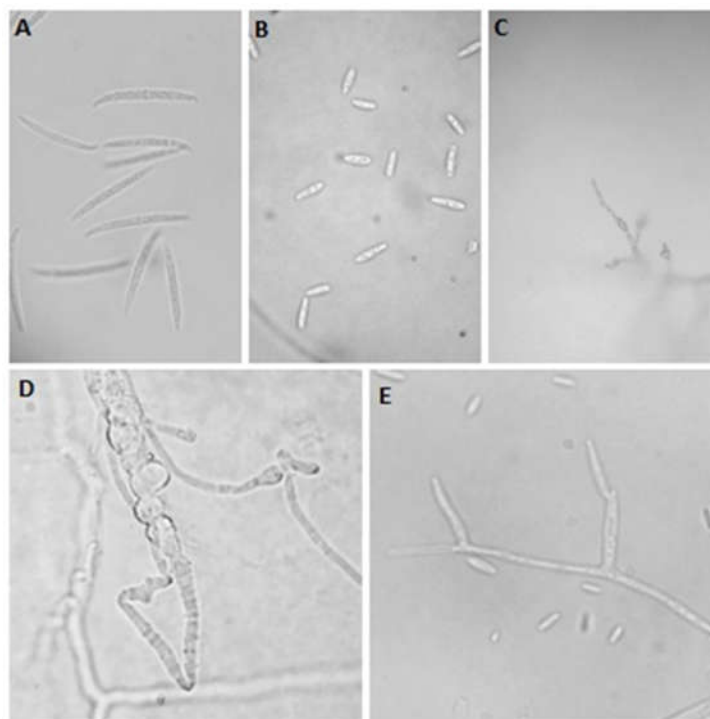


Figura 5 *Fusarium* sp. 2: A. Macroconídios, B. Microconídios, C. Microconídios em cadeia curta, D. Clamidospóros em cadeia, E. Polifíalide.

3.4 Análise de micotoxinas dos isolados

A análise de micotoxinas de isolados das espécies de *Fusarium* associados a gramíneas forrageiras, com respeito à produção de moniliformina e fumonisinas (FB₁ e FB₂) é apresentada na Tabela 3. (Anexo)

Nos dois isolados da linhagem *Fusarium* sp.1, um isolado não produziu nenhuma das micotoxinas avaliadas, já o outro produziu MON e FUM B1 e não produziu a FUM B2. Dos três isolados avaliados da linhagem *F. "claudionori"*, dois isolados produziram MON e FUM B1 e não produziram FUM B2. O outro isolado produziu MON e não produziu FUM B1 e FUM B2. Nos dois isolados avaliados de *F. mundagurra*, um isolado produziu MON, FUM B1 e FUM B2; e o outro isolado produziu MON, FUM B1 e não produziu FUM B2. O isolado avaliado de *F. proliferatum* produziu MON, FUM B1 e FUM B2. Os dois isolados avaliados de *F. thapsinum* produziram MON, FUM B1 e não produziram FUM B2. Em *F. verticillioides*, dois isolados foram avaliados, um isolado produziu MON, FUM B1 e FUM B2 e o outro isolado produziu MON e FUM B1 e não produziu FUM B2.

4 DISCUSSÃO

Esse é um dos primeiros estudos de espécies de *Fusarium* associadas a plantas de *Brachiaria* e *Panicum* como endófito. Os resultados das análises filogenéticas dos genes *EF-1a* e *RPB2* e a morfologia permitiram identificar isolados representantes dos complexos de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC), *Fusarium chlamydosporum* (FCSC), *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium graminearum* (FGSC), mostrando assim que essas gramíneas abrigam uma grande variedade de espécies de *Fusarium*. Mostra-se a presença constante de membros dos complexos FFSC em *Brachiaria* e do FIESC em *Panicum*, e uma afinidade desses complexos de espécies por esses gêneros de gramíneas. As novas linhagens denominadas neste estudo de *Fusarium* sp. 1, *Fusarium* sp. 2, *Fusarium "claudionori"* e a espécie *Fusarium mundagurra* também são do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) assim com a maioria das espécies encontradas em *Brachiaria*. Leslie et al. (2004) obteve uma diversidade de espécies do FFSC como endófitos em gramíneas nativas nas pradarias do Kansas. Foram encontradas mais dez espécies de *Fusarium* associadas a plantas do gênero *Brachiaria* no Quênia, uma dos centros de origem da *Brachiaria*, a maioria das espécies do complexo FFSC (Kago et al., 2016). *Fusarium mundagurra* é uma espécie que foi descrita recentemente,

havendo poucas informações sobre ela. É o primeiro relato dela em plantas da família *Poaceae*. Ela foi descrita pela primeira vez quando foi isolada de amostras solo e de plantas de *Mangifera indica* da Austrália (Laurence et al., 2016). A linhagem *Fusarium* “*claudionori*” ocorre também em outros hospedeiros como sorgo, milho, milheto e cana.

Na análise de sequências parciais do gene *EF-1 α* pelo método de *Máxima Parcimônia*, um grupo de isolados formou uma linhagem irmã de *F. mundagurra*, já na análise de sequências parciais do gene *RPB2* e na análise combinada (*EF-1 α* + *RPB2*), esses mesmos isolados se agruparam em dois clados, três isolados se agruparam junto ao isolado de referência de *F. mundagurra*. E dois isolados formaram um clado irmão de *F. mundagurra*, denominado neste estudo de linhagem *Fusarium* sp. 2. Essa incongruência entre as árvores é justificada, pois a região *EF-1 α* não apresentou polimorfismo suficiente para distinguir essas espécies.

Em relação a produção de micotoxinas, todas espécies analisadas foram produtoras. A capacidade de *F. mundagurra* produzir micotoxinas foi mostrada pela primeira vez. Os valores de fumonisinas e moniliformina produzidas por isolados de *F. verticillioides*, *F. thapsinum* e *F. proliferatum*, são coerentes com os observados por outros autores para essas espécies (Sharma et al., 2012; Divacara et al., 2013). *Fusarium mundagurra*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* produziram moniliformina, fumonisina B1 e B2, já *F. thapsinum* e as linhagens *Fusarium* sp. 1 e *F. “claudionori”* produziram moniliformina e apenas a fumonisina B1. Para nosso conhecimento a produção destes compostos ainda não tinha sido relatada para *Fusarium mundagurra* e deve ser adicionado à escassa informação disponível para esta espécie. Esse é o primeiro relato de isolados de *F. mundagurra* como produtores de micotoxinas.

Os resultados deste estudo podem indicar um potencial risco para a saúde dos ruminantes que se alimentam destas gramíneas e conseqüentemente para os seres humanos que consomem produtos derivados destes animais. A ocorrência de isolados produtores de micotoxinas em gramíneas forrageiras não implica necessariamente na presença da micotoxinas. Para que ocorra a produção de micotoxinas deve haver condições favoráveis de umidade e temperatura, no entanto a ameaça para a sanidade animal colocado por este fungo não deve ser subestimada.

Há indícios que *Fusarium mundagurra* e *Fusarium “claudionori”* causam podridão de colmo em milho, sorgo e milheto, evidência obtida por meio de um experimento preliminar realizado em campo, mas que ainda há a necessidade de ser reavaliado. Devido ao fato de algumas dessas espécies de *Fusarium* encontradas neste trabalho serem conhecidos patógenos de grandes culturas como o milho, sorgo e milheto, fica evidente que espécies de *Brachiaria* e *Panicum* estão servindo como reservatório de espécies fitopatogênicas, oferecendo risco para

essas culturas, ou seja, espécies provenientes de gramíneas forrageiras podem ser patogênicas a outras culturas.

5 CONCLUSÃO

A presença membros do FFSC associados a *Brachiaria* como endofíticos ou causando infecção latente sugere que estas espécies conhecidas do milho e sorgo tem espécies de *Brachiaria* como hospedeiras. A existência de espécies de *Fusarium* em outras espécies de gramíneas como *Brachiaria* e *Panicum*, evidencia que o leque de plantas hospedeiras é, na verdade, não restrito. Esse foi o primeiro relato de *F. chlamydosporum* em *Panicum* e o primeiro registro de *F. mundagurra* fora do local de descrição original.

O fato que *Brachiaria* é hospedeira de espécies produtoras de micotoxinas e importantes patógenos chama a atenção para o risco de se utilizar consórcios de espécies de *Brachiaria* e outras gramíneas forrageiras com espécies cultivadas, podendo ser uma fator de risco a saúde de animais e humanos. O presente estudo evidenciou que várias espécies ocorrem em associação com *Brachiaria* e *Panicum* e confirmou que essas gramíneas podem atuar como reservatório de importantes patógenos de grandes culturas como o milho. A distribuição geográfica dessas espécies, sua frequência nas diversas hospedeiras e sua contribuição na contaminação de gramíneas por micotoxinas ainda precisam ser avaliadas.

REFERÊNCIAS

- Aoki T, Vaughan MM, McCormick SP, Busman M, Ward TJ, Kelly A, O'Donnell K, Johnston PR, Geiser DM (2015) *Fusarium dactylidis* sp. nov., a novel nivalenol toxin-producing species sister to *F. pseudograminearum* isolated from orchard grass (*Dactylis glomerata*) in Oregon and New Zealand. *Mycologia* 107:409–418.
- Burgess LW, Summerell BA (1992) Mycogeography of *Fusarium*. Survey of *Fusarium* species from subtropical and semi-arid grassland soil from Queensland, Australia. *Mycological Research* 96:780-784.
- Carter LLA, Leslie JF, Webster RK (2008) Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and water grass. *Phytopathology* 98:992-998.
- Divakar PK, Crespo A, Núñez-Zapata J, Flakus A, Sipman HJM, Elix JA, Lumbsch HT (2013) A molecular perspective on generic concepts in the Hypotrachyna clade Parmeliaceae, Ascomycota. *Phytotaxa* 132:21-38.
- Doko MB, Rapior S, Visconti A, Schjoth JE (1995) Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *Journal of Agriculture and Food Chemical* 43:429–434.
- Freitas FCL, Ferreira LR, Ferreira FA, Santos MV, Agnes EL, Cardoso AA, Jakelaitis A (2005) Formação de pastagem via consórcio de *Brachiaria brizantha* com o milho para silagem no sistema de plantio direto. *Revista Planta Daninha* 23:49-58.
- Ghimire SR, Charlton ND, Bell JD, Krishnamurthy YL, Craven KD (2011) Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. *Fungal Diversity* 47:19-27.
- IBGE (2006) Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Rio de Janeiro. IBGE.
- Kago L, Njuguna J, Njarui DMG, Ghimire SR (2016) Fungal endophyte communities of *Brachiaria grass* (*Brachiaria* spp.) in Kenya. *Climate Smart Brachiaria grasses for Improving Livestock Production in East Africa–Kenya Experience*. In: *Proceedings of the workshop held in Naivasha, Nairobi, Kenya*. p.150-162.
- Laurence MH, Walsh JL, Shuttleworth LA, Robinson DM, Johansen RM, Petrovic T, Vu TTH, Burgess W, Summerell BA, Liew ECY (2016) Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. *Fungal Diversity* 77:349-366.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory Manual*. Sydney. Blackwell.
- Leslie JF, Zeller KU, Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Ritiene A (2004) Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2254-2262.

Martuscello JA, Jank L, Fonseca DM, Cruz CD, Cunha DHFV (2007) Repetibilidade de caracteres agrônômicos em *Panicum maximum* Jacq. Revista Brasileira de Zootecnia 36:1975-1981.

Nelson PE, Toussoun TA, Burgess LW (1987) Characterization of *Fusarium beomiforme* sp. nov. Mycologia 79:889-889.

Nichea MJ, Cendoya E, Zachetti VGL, Chiacchiera SM, Sulyok M, Krska R, Ramirez ML (2015) Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed. World Mycotoxin Journal 8:451-457.

O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley RT, Zitomer NC, Colyer P, Waalwijk C, Lee T, Moretti A, Kang S, Kim H-S, Geiser DM, Juba JH, Baayen RP, Cromey MG, Bithell S, Sutton DA, Skovgaard K, Ploetz R, Corby Kistler H, Elliott M, Davis M, Sarver BA (2009) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genetics Biology 46:936-948.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences 95:2044-2049.

Parich A, Boeira LS, Castro SP, Krska R (2003) Determination of moniliformin using SAX Column Clean-up and HPLC/DAD-detection. Mycotoxin Research 19:203-206.

Pereira AR (2006) Como selecionar plantas para áreas degradadas e controle de erosão. Belo Horizonte. FAPI.

Petrovic T, Burgess LW, Cowie I, Warren RA, Harvey PR (2013) Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize. European Journal Plant Pathology 136:773-788.

Pivello VR, Shida CN, Meirelles ST (1999) Alien grasses in Brazilian savannas: a threat to biodiversity. Biodiversity & Conservation 8:1281-1294

Rodrigues DC (2004) Produção de forragem de cultivares de *Brachiaria brizantha* (Host. ex A. Rich.) Stapf e Modelagem de respostas produtivas em função de variáveis climáticas. Piracicaba. Dissertação, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Serrão EAS, Simão Neto M (1931) Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evrard. vol. 2. n. 1. Belém. Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN).

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany 1:1-26.

Sherphard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA (1990) Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescent detection. *Journal of Liquid Chromatography* 13:2077-2087.

Soares Filho CV (1994) Recomendações de espécies e variedades de *Brachiaria* para diferentes condições. In: 11º Simpósio sobre Manejo de Pastagens, Resumos... Piracicaba, SP. FEALQ. p. 325.

Souza ED, Costa SEVGA, Lima CVS, Anghinoni I, Meurer EJ, Carvalho PCF (2008) Carbono orgânico e fósforo microbiano em sistema de integração agricultura-pecuária submetido a diferentes intensidades de pastejo em plantio direto. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 32:1273-1282.

Summerell BA, Rugg CA, Burgess LW (1995) Characterization of *Fusarium babinda* sp. nov. *Mycological Research* 99:1345-1348.

Swett CL, Gordon TR (2012) First report of grass species (*Poaceae*) as naturally occurring hosts of the pine pathogen *Gibberella circinata*. *Plant Disease* 96:908-908.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stercher 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 Acid Research* 22:4673-4680.

Timossi PC, Durigan JC, Leite GJ (2007) Formação de palhada por braquiárias para adoção do sistema plantio direto. *Bragantia* 66:617-622.

Valle CB (1991) Avaliação de Germoplasma e Melhoramento Genético de Braquiárias. In: Paulino VT. In: 2º Encontro para discussão sobre capins do gênero *brachiaria*, Resumos... Nova Odessa, Instituto de Zootecnia, p. 301-342.

Valle CB, Jank L, Resende RMS (2009) O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Revista Ceres* 56:460-472.

Walsh JL, Laurence MH, Liew ECY, Sagalang AE, Burgess LW, Summerell BA, Petrovic T (2010) *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity* 44:149-15.

ANEXOS

Tabela 2. Códigos de acesso de sequências de espécies do FFSC e FCSC correspondentes às regiões gênicas *EF-1a* e *Rpb2* depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas (continua).

Código	Espécie	Hospedeiro	Origem	EF-1a	Rpb2
NRRL 66233	<i>F. coicis</i>	<i>Coix gasteenii</i>	Austrália	KP083251	KP083274
CBS 119857	<i>F. andiyazi</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	KR071718	KT 154004
NRRL 66235	<i>F. mundagurra</i>	Solo	Austrália	KP083256	KP083276
NRRL 66243	<i>F. tjaetaba</i>	<i>Sorghum interjectum</i>	Austrália	KP083263	KP083275
NRRL 13999	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	Índia	AF160278	JX171580
NRRL 25059	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Honduras	FN552086	FN552108
MUCL 43479	<i>F. verticillioides</i>	<i>Zea mays</i>	EUA	FN54360	FN552100
NRRL 13566	<i>F. fujikuroi</i>	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan	AF160279	JX171570
NRRL 13448	<i>F. nygamai</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Austrália	AF160273	EF470114
NRRL 22016	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	EUA	AF160289	JX171599
NRRL 22045	<i>F. thapsinum</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	AF160270	JX171600
NRRL 25331	<i>F. circinatum</i>	<i>Pinus radiata</i>	EUA	AF160295	JX171623
NRRL 20433	<i>F. inflexum</i>	<i>Vicia faba</i>	Alemanha	AF8479	JX171583
NRRL 22944	<i>F. proliferatum</i>	<i>Cattleya</i> sp.	Alemanha	AF160280	JX171617
NRRL 25226	<i>F. mangiferae</i>	<i>Mangifera indica</i>	Índia	AF160281	JX171622
NRRL 13617	<i>F. phyllophilum</i>	<i>Dracaena deremensis</i>	Itália	AF160274	---
CML 262	<i>F. tupiense</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	DQ445781	---
MUCL 52450	<i>F. temperatum</i>	<i>Zea mays</i>	Bélgica	HM067687	---
NRRL 28852	<i>F. fractiflexum</i>	<i>Cymbidium</i> sp.	Japão	AF160288	---
NRRL 13592	<i>F. pseudonygamai</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	Nigéria	AF160263	---
NRRL 25206	<i>F. pseudoanthophilum</i>	<i>Zea mays</i>	Zimbábwe	AF160264	---
NRRL 25446	<i>F. brevicatenum</i>	<i>Striga asiatica</i>	Madagascar	AF160265	---
NRRL 22902	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	EUA	AF160312	---
NRRL 25302	<i>F. denticulatum</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	EUA	AF160269	---
NRRL 13604	<i>F. napiforme</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	África do Sul	AF160266	---
NRRL 26131	<i>F. globosum</i>	<i>Zea mays</i>	África do Sul	AF160285	---
NRRL 13308	<i>F. acutatum</i>	desconhecido	Índia	AF160276	---
NRRL 13602	<i>F. anthophilum</i>	<i>Hippeastrum</i> sp.	Alemanha	U61541	---
NRRL 25181	<i>F. concentricum</i>	<i>Musa sapientum</i>	Costa Rica	AF 160282	---
NRRL 13164	<i>F. dlamini</i>	<i>Zea mays</i>	África do Sul	AF160277	---
NRRL 25200	<i>F. lactis</i>	<i>Ficus carica</i>	EUA	AF160272	---
NRRL 25623	<i>F. sterilihyphosum</i>	<i>Mangifera indica</i>	Desconhecido	DQ452858	---
NRRL 25300	<i>F. begoniae</i>	<i>Begonia elatior</i>	Alemanha	AF160293	---

NRRL 22946	<i>F. pseudocircinatum</i>	<i>Solanum</i> sp.	Gana	AF160271	---
NRRL 13618	<i>F. bulbicola</i>	<i>Nerine bowdenii</i>	Holanda	AF 160294	---
NRRL 20476	<i>F. bactridioides</i>	<i>Cronartium conigenum</i>	EUA	AF160290	---
NRRL 13613	<i>F. succisae</i>	<i>Succisa pratensis</i>	Alemanha	AF 160291	---
NRRL 22949	<i>F. udum</i>	desconhecido	Alemanha	AF160275	---
MRC 8544	<i>F. konzum</i>	<i>Sorghastrum nuttans</i>	EUA	EU220234	---
NRRL 25208	<i>F. ramigenum</i>	<i>Ficus carica</i>	EUA	AF160267	---
NRRL 28578	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>Colocasia esculenta</i>	Cuba	GQ505405	---
NRRL 34013	<i>F. chlamydosporum</i>	Humano	EUA	GQ505408	---
NRRL 43631	<i>F. chlamydosporum</i>	Humano	EUA	GQ505427	---
NRRL 13338	<i>F. nelsonii</i>	Solo	Austrália	GQ505402	---
NRRL 43641	<i>F. armeniacum</i>	Animal	EUA	GQ505430	---
RBG 5743	<i>F. aywerte</i>	Solo	Austrália	KP083250	---
NRRL 66246	<i>F. tjaynera</i>	<i>Triodia microstachya</i>	Austrália	EF107152	---
NRRL 34033	<i>F. brachygibbosum</i>	Humano	EUA	GQ505418	---
NRRL 45999	<i>F. flocciferum</i>	Humano	EUA	GQ505433	---
NRRL 13459	<i>F. concolor</i>	Planta	África do Sul	GQ505674	---

^aCódigo dos isolados: **CML**, Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; **MRC**, Medical Research Council, Tygerberg, South Africa; **MUCL**, Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium; **NRRL**, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, EUA; **CBS**, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda; **RBG**, Royal Botanic Gardens Trust, Sydney, New South Wales, Austrália; **EF-1 α** : Fator de alongação 1- α ; **Rpb2**: Segunda maior subunidade da RNA polimerase.

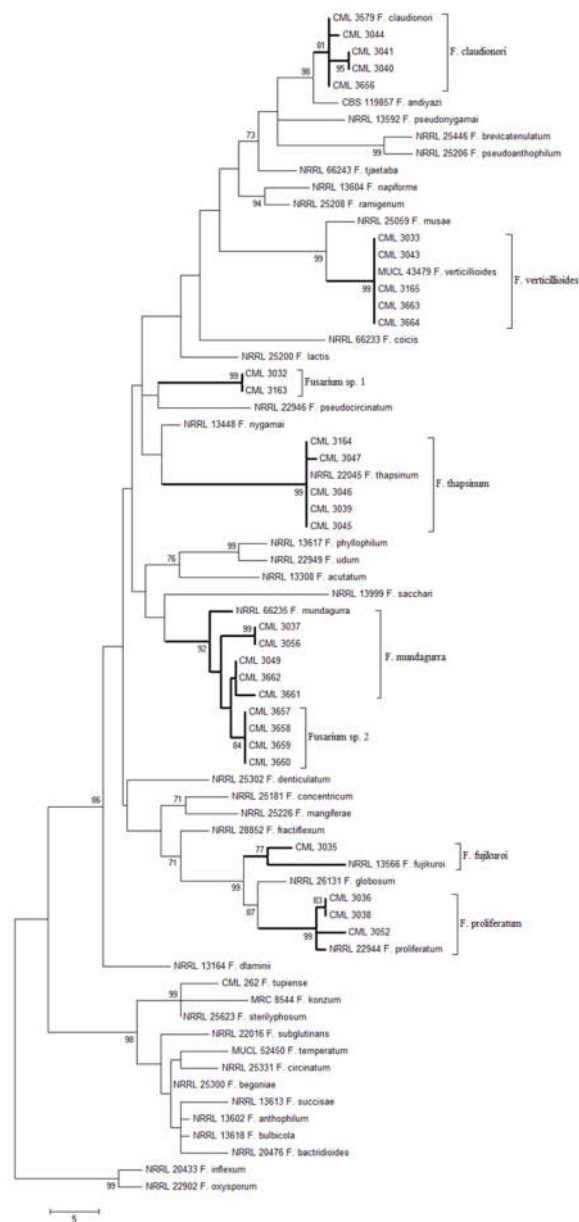


Figura 6 Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de sequências do gene *EF-1a* de isolados de *Fusarium* obtidos nesse trabalho e de isolados de referência pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CML: Coleção Micológica de Lavras; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; MUCL: Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium; NRRL: Northern Regional Research Laboratory.

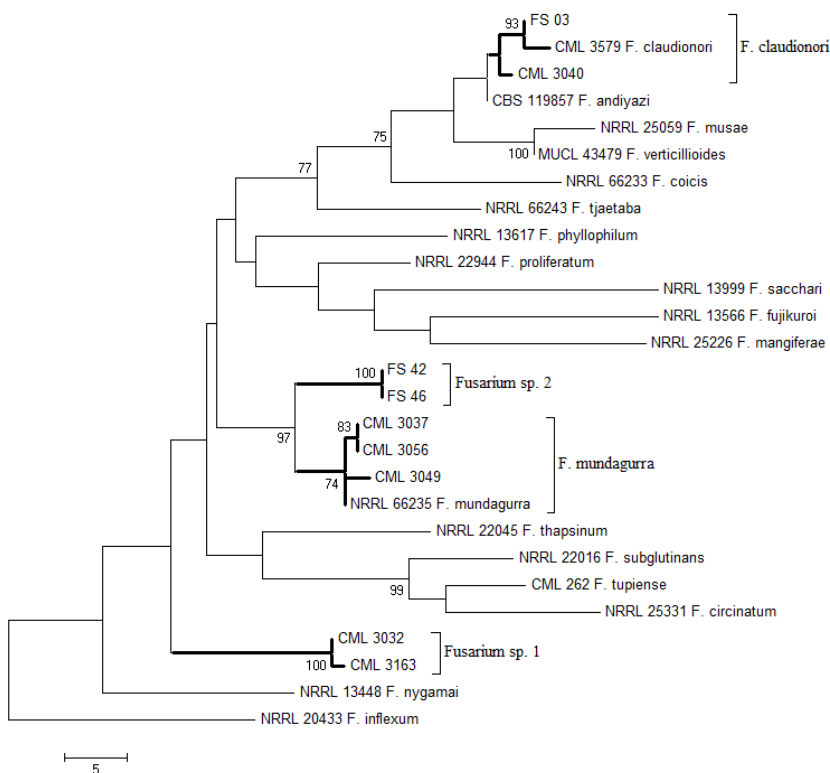


Figura 7 Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir de seqüências do gene *RPB2* de isolados de *Fusarium* obtidos nesse trabalho e de isolados de referência pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CML: Coleção Micológica de Lavras; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; MUCL: Mycotheque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium; NRRL: Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, EUA.

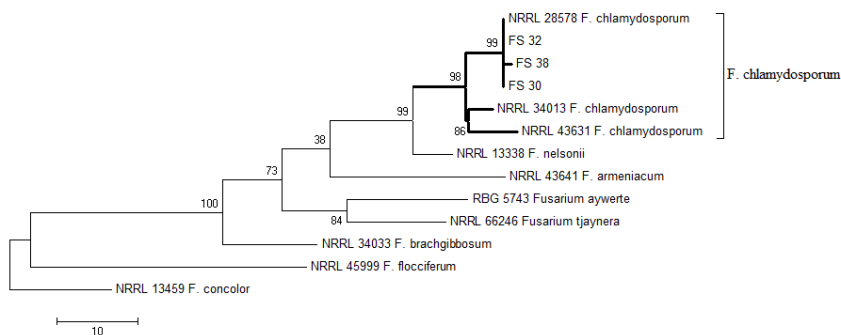


Figura 8 Árvore filogenética gerada pela análise de *Máxima parcimônia* a partir do gene *EF-1a* de isolados de *Fusarium chlamydosporum* obtidos nesse trabalho e isolados de referência. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos nós. Abreviações das coleções de culturas: CML: Coleção Micológica de Lavras; NRRL: Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, EUA; RBG Royal Botanic Gardens Trust, Sydney, New South Wales, Australia.

Tabela 3 Análise de micotoxinas de espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas forrageiras, com respeito à produção de moniliformina e fumonisinas (FB1 e FB2).

Espécie	Código	MON (ug/gr) ^a	FB₁ (ug/gr) ^b	FB₂ (ug/gr) ^c
<i>Fusarium</i> sp. 1	CML3032	ND	ND	ND
	CML3163	3,2	5,5	ND
<i>F. "claudionori"</i>	CML3041	96,7	44,2	ND
	CML3040	15	18,2	ND
	CML3044	1,9	310,9	ND
<i>F. mundagurra</i>	CML3037	4,8	116,6	461,9
	CML3049	15	18,2	ND
<i>F. proliferatum</i>	CML3036	100,7	814,3	220,6
<i>F. thapsinum</i>	CML3039	18,2	38,2	ND
	CML3046	86	27,6	ND
<i>F. verticillioides</i>	CML3043	44,4	96,5	ND
	CML3165	2,2	416,4	137,4

^(a)Moniliformina, limite de detecção: 1 µg/g

^(b)Fumonisina B₁, limite de detecção: 1 µg/g

^(c)Fumonisina B₂, limite de detecção: 1 µg/g

ND: não detectado