



EGÍDIO JOSÉ ARAGÃO DA PONTE

**ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium fujikuroi* CAUSAM
PODRIDÃO DO COLMO DE MILHETO GRANÍFERO NO
BRASIL**

**LAVRAS – MG
2024**

EGÍDIO JOSÉ ARAGÃO DA PONTE

**ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium fujikuroi* CAUSAM PODRIDÃO DO COLMO
DE MILHETO GRANÍFERO NO BRASIL**

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

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

**LAVRAS - MG
2024**

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

Ponte, Egídio José Aragão da.

Espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* causam podridão do
colmo de milho granífero no Brasil / Egídio José Aragão da
Ponte. - 2024.

32 p. : il.

Orientador(a): Ludwig Heinrich Pfenning.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Doença de planta. 2. Filogenia molecular. 3. *Pennisetum
glaucum*. I. Pfenning, Ludwig Heinrich. II. Título.

EGÍDIO JOSÉ ARAGÃO DA PONTE

**ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium fujikuroi* CAUSAM PODRIDÃO DO COLMO
DE MILHETO GRANÍFERO NO BRASIL**

**SEVERAL SPECIES OF THE *Fusarium fujikuroi* SPECIES COMPLEX CAUSE
STALK ROT OF GRAIN MILLET IN BRAZIL**

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

APROVADA em 28 de maio de 2024

Dr. Edson Ampélio Pozza UFLA

Dr. José Maria Villela Pádua UFLA

Dr. Fernando da Silva Rocha UFMG

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

**LAVRAS - MG
2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realizar meu mestrado.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Sou grato a todos os professores pelo conhecimento transmitido, contribuindo com minha formação acadêmica.

Agradeço aos meus pais, Márcia Aragão da Ponte e Antônio Mário Araújo da Ponte por toda a minha formação, educacional, pessoal e profissional que me foi permitida graças a eles, especialmente em possibilitar a realização deste mestrado.

Sou muito grato ao meu orientador Prof. Ludwig H. Pfenning por sua confiança em meu trabalho, além dos conhecimentos e conselhos transmitidos que agregaram muito na minha vida pessoal e profissional.

Agradeço aos amigos formados em Lavras, em especial Janaína Martins de Sousa e Gabriely Serrão Freire, por todo o apoio, amizade e carinho compartilhados nestes dois anos.

Agradeço especialmente a Ana Carolina Silva Galdino, João Victor Rodrigues Corso e Ana Caroline de Souza Barros por auxílios fundamentais para a realização do meu trabalho;

Também sou grato aos demais membros do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos pelo apoio e trabalho em equipe, cujo suporte foi fundamental para conclusão deste mestrado.

Agradeço aos membros da banca Dr. Edson Ampélio Pozza, Dr. José Maria Villela Pádua e Dr. Fernando da Silva Rocha por terem aceito o convite e pela colaboração neste trabalho.

Obrigado a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O milho granífero é uma planta adaptada a regiões áridas por sua rusticidade e destinada à alimentação animal e humana. No Brasil, a cultura é voltada para o uso como cobertura em sistemas de plantio direto, além da produção forrageira e granífera. Entre os aspectos que limitam a produção destas plantas, fungos causam doenças na cultura, e destes destacam-se espécies do gênero *Fusarium*, que comprometem o rendimento da cultura e a segurança alimentar dos grãos, através da produção de micotoxinas. A literatura primária sobre a associação milho – *Fusarium* é escassa, embora tenha ocorrido vasta expansão da cultura no Brasil em tempo recente. Nesse estudo, foi investigado quais espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC podem ser encontradas em associação ao colmo de milho granífero e quais induzem sintomas de doença. A partir de colmos sintomáticos e assintomáticos foi obtida uma coleção de 18 isolados com características morfológicas de *Fusarium fujikuroi*, provenientes de diferentes regiões produtoras no Brasil. Foram identificadas seis diferentes espécies do FFSC por meio de análise de filogenia molecular de sequências da região gênica *tefl*. Todas as espécies causaram podridão do colmo no milho quando inoculadas em plantas jovens. A partir do conhecimento obtido é possível identificar e monitorar os agentes etiológicos, desenvolver estratégias para mitigar o possível dano e contribuir para o manejo fitossanitário. Também será possível subsidiar programas de melhoramento para seleção de híbridos resistentes. A possibilidade de que diversas gramíneas servem como fonte de inóculo de patógenos de importantes culturas, principalmente gramíneas, deve ser investigada.

Palavras chave: Doença de planta; Filogenia molecular; *Pennisetum glaucum*.

ABSTRACT

Grain millet is a plant adapted to arid regions due to its rusticity and used for animal and human consumption. In Brazil, the crop has its main use as cover in no tillage systems, but also to forage and grain production. Among the aspects that limit the production of this crop are fungi that cause diseases, including species of the genus *Fusarium*, which compromise crop yield and grain food safety through the production of mycotoxins. The primary literature on the millet – *Fusarium* association is scarce, although there has been a vast expansion of the culture in Brazil in recent times. In this study, it was investigated which species of the *Fusarium fujikuroi* FFSC complex can be found in association with grain millet stalks and which ones induce disease symptoms. From symptomatic and asymptomatic stalks, a collection of 18 isolates with morphological characteristics of *Fusarium fujikuroi* was obtained, from different producing regions in Brazil. Six different FFSC species were identified through molecular phylogenetic analysis of *tefl* gene region sequences. All species caused stalk rot in millet when inoculated in young plants. Based on the knowledge obtained, it is possible to identify and monitor etiological agents, develop strategies to mitigate possible damage and contribute to phytosanitary management. It will also be possible to subsidize breeding programs to select resistant hybrids. The possibility that various grasses serve as a source of inoculum for pathogens of important crops, especially grasses, should be investigated.

Keywords: Molecular phylogeny; Plant Disease; *Pennisetum glaucum*.

IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

Estudamos a diversidade do gênero *Fusarium*, que ocorre em associação com plantas cultivadas e da vegetação natural. A identificação das espécies de acordo com conceitos modernos é um pré-requisito para o desenvolvimento de diversas tecnologias. Verificamos a distribuição em território nacional, identificamos seus hospedeiros e seu comportamento como patógeno, endófito ou produtor de micotoxinas. O fenômeno da patogenicidade é resultado da interação entre o fungo e a planta hospedeira, influenciado ainda por solo e clima. A prática de uma agricultura tropical altamente diversificada, tecnológica e inovadora no Brasil resulta em variações consideráveis e relevantes. Os resultados gerados dão suporte à diagnose e ao monitoramento de doenças, à implementação de estratégias de controle, integrando uso de produtos químicos e biológicos, e ainda ao desenvolvimento de germoplasma vegetal com resistência genética. Representam pré-requisito indispensável para o desenvolvimento de tecnologia de detecção por PCR, baseada em polimorfismo único de DNA do organismo alvo.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

We are investigating the diversity of the genus *Fusarium*, which occurs in association with cultivated plants and natural vegetation. Species identification according to modern concepts is a prerequisite for the development of various technologies. We verified its distribution throughout the country, identified its hosts and its behavior as a pathogen, endophyte or producer of mycotoxins. The phenomenon of pathogenicity is the result of the interaction between the fungus and the host plant, also influenced by soil and climate. The practice of highly diversified, technological and innovative tropical agriculture in Brazil results in considerable and relevant variations. The results generated support the diagnosis and monitoring of diseases, the implementation of control strategies, integrating the use of chemical and biological products, but also the development of plant germplasm with genetic resistance. They represent an indispensable prerequisite for the development of PCR detection technology, based on unique DNA polymorphisms of the target organism.

SUMÁRIO

1	Capítulo 1	8
1.1	Introdução	8
1.2	Estado da arte	8
1.2.1	Cultura do milheto	8
1.2.2	<i>Fusarium fujikuroi</i> FFSC associado a gramíneas	10
	Referências	13
2	Capítulo 2	17
2.1	Resumo	17
2.2	Introdução	20
2.3	Material e métodos	21
2.4	Resultados	23
2.5	Discussão	24
2.6	Agradecimentos	26
	Referências	27
	Anexos	31

Capítulo 1

1.1 Introdução

O milheto granífero (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.), originário do oeste africano, representa uma importante base alimentar para populações e criações animais nos continentes Africano e Asiático (Oumar et al. 2008, Yadav e Rai 2013). No Brasil, a cultura foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul para uso na alimentação animal e recentemente é utilizada no Cerrado brasileiro como planta de rotação e incorporação no sistema de plantio direto e cultivo mínimo. Um reflexo do crescimento no cultivo de milheto granífero no Brasil se dá com o aumento das áreas produtivas, estimado em 4 milhões de hectares voltados a cobertura de solo e 300mil hectares para a produção de grãos (ATTO 2024; Landau e Pereira-Filho 2016).

O milheto granífero destaca-se por sua capacidade de adaptação a ambientes áridos, comportamento justificado pela rusticidade, tolerância à seca e a solos pouco férteis, baixa incidência de doenças, que lhe confere vantagem ao milho e sorgo (Landau e Pereira-Filho 2016; Santos et al. 2017). O cultivo como planta de cobertura gera ciclagem e acúmulo de nutrientes e matéria orgânica com a incorporação da planta ao solo, além de auxiliar no manejo de plantas daninhas, retenção de água e evitar a erosão do solo (Marcelo et al. 2012; Silva et al. 2023).

Porém, a presença de patógenos em campo compromete o rendimento do milheto, devido a doenças foliares, no colmo ou contaminação dos grãos (Chala et al. 2014; Choi et al. 2021; Kaurav et al. 2018; Wilson 2002). Espécies de *Fusarium* foram descritas como agentes causais da contaminação de grãos de milheto no Oeste africano (Onyike e Nelson 1991). Foram relatadas 18 espécies de *Fusarium* associadas com proso millet na Coreia (Choi et al. 2021).

Dentre os fungos associados à família *Poaceae*, espécies de FFSC são relatadas frequentemente com diferentes hábitos: patógenos, saprófitas, endófitos ou produtores de micotoxinas. Plantas de milheto, sorgo e milho apresentaram sintomas de podridão quando inoculadas por isolados obtidos da cana-de-açúcar, demonstrando que as espécies de FFSC não são específicas ao hospedeiro da qual foram recuperadas (Costa et al. 2019). E ainda faltam informações sobre a ocorrência de fungos do gênero *Fusarium* no milheto no Brasil.

1.2 Estado da arte

1.2.1 Cultura do milheto

O cultivo de milheto é originário e milenar em regiões áridas e semiáridas dos continentes Asiático e Africano, devido a características que a adaptaram a tais regiões, como:

rusticidade, resistência a seca, baixa necessidade nutricional e baixa incidência de doenças (Yadav e Rai, 2013). O termo milheto compreende diversas espécies de plantas, que formam um grupo conhecido como “millets”. Os membros deste grupo apresentam características morfológicas similares, como o formato das folhas, inflorescências e a produção de pequenos grãos arredondados (Sharma e Niranjana 2018). Neste grupo se destacam o “foxtail millet” (*Setaria italica*), “finger millet” (*Eleusine carocana*), “proso millet” (*Panicum miliaceum*), e principalmente, o “pearl millet” (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.), ou milheto granífero, principal millet cultivado no Brasil e no mundo. A colheita total de grãos de millets ao redor do mundo foi estimada em 30.859.664 Ton (FAO 2024; Sharma e Niranjana 2018).

A origem de *P. glaucum* é relatada na África Saheliana, cuja produção representa 50% do cultivo mundial do grão, e atua como base alimentar para essas populações. Dentre os maiores produtores de grãos, a Índia é o destaque (Oumar et al. 2008; Yadav e Rai 2013). Dentre os diversos usos do grão, variedades de “finger millet” são utilizadas na produção de cervejas e também servem de alimento para populações na Índia e África ocidental e central (Devi et al. 2014; Singh e Raghuvanshi 2012). O “Proso millet” é utilizado em grande escala na produção de ração para pássaros nos EUA, apesar de haverem estudos que projetam o aumento da produção para suprir demandas alimentícias e da indústria local (Habiyaemye et al. 2017). A produção de “Foxtail Millet” é considerada a segunda maior no mundo dentre os millets, depois de *P. glaucum*. A China é a principal produtora do Foxtail millet, sendo este o mais produzido dentre os millets neste país (Sharma e Niranjana 2018).

No Brasil, a planta foi introduzida na primeira metade do século 20 no estado do Rio Grande do Sul, destinada à alimentação de animais como ingrediente de ração ou como silagem, não trazendo prejuízo quando incorporada à alimentação de rebanhos no lugar do milho, principal grão utilizado (Abreu et al. 2014; Alonso et al. 2017; Landau e Pereira-Filho 2016). Recentemente, o cultivo do milheto se expandiu para a região do Cerrado brasileiro, como planta de rotação e incorporação no sistema de plantio direto (Landau e Pereira-Filho 2016). Neste sistema, o uso do milheto traz muitas vantagens, conferindo cobertura morta, manutenção de água e matéria orgânica no solo, ciclagem de nutrientes, supressão da densidade e diversidade de plantas daninhas e, principalmente, evitando a erosão do solo. (Marcelo et al. 2012; Silva et al. 2023).

Em termos produtivos, o cultivo do milheto é, na maioria das regiões do mundo, executado por pequenos produtores em regiões áridas, voltado à subsistência com baixas produtividades, em condições que outras culturas não renderiam tanto quanto o milheto. No

Brasil, é relatada a produtividade média de 2.110kg/ha ainda pequena quando comparada à produtividade média de 5.414kg/ha do milho no Brasil na safra 2023/24 (ATTO 2024; Conab 2024). Em termos de fertilidade de solos, o milheto apresenta um eficiente sistema radicular, que permite vantagem frente ao milho e sorgo no cerrado brasileiro. O milheto também possui boa adaptabilidade a solos de baixa fertilidade e ácidos, apesar da cultura possuir boa resposta a adubação e correção do solo (Landau e Pereira Filho 2016). Considerando o uso do milheto principalmente como cultura de rotação em safrinha, a planta pode receber pouca ou nenhuma adubação complementar, se valendo do residual da cultura anterior (Marcelo et al. 2012).

Existem poucas referências sobre valores de adubação para a cultura indicadas para produção de grãos. Os valores indicados são na ordem de 20 a 30 kg/ha em semeadura e 60 a 80 kg/ha para N no início do perfilhamento. As doses de P e K recomendadas variam em função da disponibilidade dos elementos no solo, variando entre 20-100 kg/ha e 30-120 kg/ha, respectivamente (Landau e Pereira-Filho 2016).

A mudança no hábito do consumo do milheto tem sido encorajada devido aos aspectos nutritivos do grão, assim como em iniciativas para uma mudança cultural e produtiva no papel do milheto para a sociedade (Devi et al. 2014; Habiyaemye et al. 2017; Sharma e Niranjana 2018). No Brasil, o grão de milheto teve recente regulamentação para a alimentação humana, por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 493/2021, na qual foi autorizado o uso do grão como insumo na produção de produtos alimentícios, tais como biscoitos e massas (ANVISA 2021). Os benefícios do uso de milheto na fabricação de produtos alimentícios e na alimentação humana têm descrição recente (Dias-Martins et al. 2018).

No entanto, a presença de patógenos em campo compromete o rendimento do milheto, devido a doenças foliares, no colmo ou/e contaminação dos grãos (Chala et al. 2014; Choi et al. 2021; Kaurav et al. 2018; Wilson 2002). Espécies de *Fusarium* foram apontadas como agentes causais da contaminação de grãos de milheto no Oeste africano (Onyike e Nelson 1991). Foram relatadas 18 espécies de *Fusarium* associadas com “proso millet” na Coreia (Choi et al. 2021).

1.2.2 *Fusarium fujikuroi* FFSC associado a gramíneas.

O *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC é um grupo monofilético, com espécies estabelecidas com base em relações filogenéticas (O'Donnell et al. 1998a). Historicamente fungos deste complexo eram relatados como *F. moniliforme*, classificado como patógeno a diversas culturas (Aoki et al. 2014). *Fusarium moniliforme* é uma nomenclatura em desuso e

que atualmente compreende diversas espécies do complexo FFSC (O'Donnell et al. 1998a) tais como *F. andiyazi*, *F. nygamai*, *F. pseudonygamai*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides*, obtidos em milheto, sorgo e milho na África do Sul (Leslie et al. 2005).

Além do conceito de espécies filogenéticas, o conceito de espécies biológicas é amplamente utilizado em fungos do complexo *fujikuroi*, com a identificação de 13 espécies biológicas no complexo de espécies, a partir do desenvolvimento de testadores de “mating type” (Leslie 1995; Lima et al. 2012). As mating populations de FFSC são heterotáticas (Leslie e Summerell 2006).

As espécies de FFSC possuem distribuição filogeográfica, aspecto estabelecido a partir da análise da filogenia de quatro genes, dividindo as espécies em três clados originados nos continentes Africano, Americano e Asiático, com pelo menos 56 espécies filogenéticas distintas (O'Donnell et al. 1998b; Munkvold et al. 2021). Dentre os fungos associados à família de *Poaceae*, espécies de FFSC possuem relatos associados a diferentes hábitos: patógenos, saprófitas, endófitos ou produtores de micotoxinas, comportamentos observados em Cana-de-açúcar, Arroz, Braquiária, Milho, Sorgo e Milheto granífero (Costa et al. 2019; Maia et al. 2021; Singh e Sunder 2012; Vismer et al. 2019).

Estes patógenos causam doenças em diversos hospedeiros, como o “bakanae” do arroz (*F. fujikuroi*), “pokkah boeng” na cana-de-açúcar (*F. sacchari*), má formação em mangueira, ipê rosa e mogno (Costa et al. 2019; Gupta et al. 2015; Lima et al. 2012; Montoya-Martínez et al. 2021; Santillán-Mendoza et al. 2018). Foi registrada a ocorrência de espécies de FFSC como patógenos gerando sintomas de podridão, causando perdas na produção de gramíneas, afetando milho, cana de açúcar e sorgo (Cotten e Munkvold 1998; Costa et al. 2019; Kelly et al. 2017). Plantas de milheto, sorgo e milho apresentaram sintomas quando inoculadas por isolados obtidos da cana-de-açúcar, demonstrando que as espécies de FFSC não são limitadas ao hospedeiro da qual foram recuperadas e dificulta o manejo em campo (Costa et al. 2019). Os sintomas descritos em literatura descrevem o crescimento longitudinal do sintoma nos tecidos internos, por vezes com avermelhamento do interior do colmo (Kelly et al. 2017; Petrovic et al. 2009; Wilson 2002). Este complexo também está associado à contaminação de diversos grãos por micotoxinas (Choi et al. 2021; Costa et al. 2019; Nicolli et al. 2020).

Espécies de FFSC são conhecidas por produzirem grande variedade de micotoxinas, metabólitos secundários com efeitos tóxicos na saúde humana e animal destaque para as fumonisinas, mas também moniliformina, beauvericina e enniatina (O'Donnell et al. 2018; Proctor et al. 2009). Fumonisinas ocorrem em todo o mundo, muito associadas a cultura do

milho e arroz, especialmente em climas quentes (Munkvold et al. 2021; Nicolli et al. 2020). Apesar de possuírem estruturas químicas simples, seus efeitos podem ser diversos e complexos em sistemas animais. A ação de fumonisinas é carcinogênica em roedores, causa leucoencefalomalácia em cavalos e também é associada ao câncer esofágico em humanos (Desjardins e Proctor 2007).

O cluster gênico responsável pela produção de fumonisinas possui distribuição descontínua dentro de FFSC, dessa forma a presença do cluster e a capacidade de produção da micotoxina podem variar dentre espécies do complexo. A produção de fumonisinas foi detectada em apenas seis espécies do complexo, dentre as quais *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. nygamai* são frequentemente detectados como produtores de fumonisinas (Aoki et al. 2014).

Em gramíneas, as fumonisinas são fitotóxicas em milho, gerando murcha, clorose e necrose, além de inibir o crescimento radicular, apesar de não estarem associadas com a capacidade do fungo em causar a podridão da espiga (Munkvold et al. 2021). Foi detectada a produção de fumonisinas em associação a grãos ao redor do mundo. *Fusarium fujikuroi*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* foram os principais produtores detectados em grãos de “proso millet”, arroz, sorgo e milho. Também já foram encontrados *F. pseudocircinatum*, *F. nygamai* e *F. pseudonygamai* produzindo tais compostos (Choi et al. 2021; Leslie et al. 2005; Nicolli et al. 2020; Vismer et al. 2019). Porém, em milheto granífero foram observadas baixas incidências de fumonisinas em amostras isoladas de campo e também quando testadas, o que atesta uma baixa importância de FFSC como produtor de micotoxinas em condições pré e pós colheita nesta cultura (Jurjevic et al. 2007).

REFERÊNCIAS

- Abreu RCD, Kiefer C, Alves FV, Marçal DA, Oliveira BFD, Martins LP, Rosa EM (2014) Milheto em dietas de suínos em crescimento e terminação. *Ciência Rural* 44:1639-1644
- Alonso MP, De Moraes EHBK, Pereira DH, dos Santos Pina D, Mombach MA, Hoffmann A, Gimenez BM, Sanson RMM (2017) Pearl millet grain for beef cattle in crop-livestock integration system: intake and digestibility. *Semina: Ciências Agrárias* 38:1461-1471
- Anvisa, 2021. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 493, DE 15 DE ABRIL DE 2021. <Ministério da Saúde (saude.gov.br)>
- ATTO Sementes (2024) obtido de: <https://attosementes.com.br/grao-do-ano-de-2023-pela-onu-cultura-do-milheto-avanca-no-brasil>. Acesso em: 31/05/2024 às 15:35
- Aoki T, O'Donnell K, Geiser DM (2014) Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology* 80:189-201
- Chala A, Taye W, Ayalew A, Krska R, Sulyok M, Logrieco A (2014) Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Garten) from Ethiopia. *Food Control* 45:29-35
- Choi JH, Nah JY, Lee MJ, Jang JY, Lee T, Kim J (2021) *Fusarium* diversity and mycotoxin occurrence in proso millet in Korea. *Food Science and Technology* 141:110964
- CONAB. Milho, Safra 2023-2024. Available at: https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/53198_58fd2bffb39995b1d4bff114675f30f8. Acesso em 31/05/2024
- Costa MM, Melo MP, Guimarães EA, Veiga CMO, Carmo FS, Moreira GM, Costa SS, Pfenning LH (2019) Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with pokkah boeng of sugarcane in Brazil. *Plant Pathology* 68:1350-1360
- Cotten TK, Munkvold GP (1998) Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology* 88:550-555
- Devi PB, Vijayabharathi R, Sathyabama S, Malleshi NG, Priyadarisini VB (2014) Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: a review. *Journal of Food Science and Technology* 51:1021-1040
- Desjardins AE, Proctor RH (2007) Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119:47-50

Dias-Martins AM, Pessanha KL, Pacheco S, Rodrigues JAS, Carvalho CWP (2018) Potential use of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) in Brazil: food security, processing, health benefits and nutritional products. *Food Research International* 109:175-186

FAO (2024) FAOSTAT. Área colhida e produção nos principais países produtores de milheto. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>

Gupta AK, Solanki IS, Bashyal BM, Singh Y, Srivastava K (2015) Bakanae of rice-an emerging disease in Asia. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences* 25

Habiyaremye C, Matanguihan JB, D'Alpoim Guedes J, Ganjyal GM, Whiteman MR, Kidwell KK, Murphy KM (2017) Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) and its potential for cultivation in the Pacific Northwest, US: a review. *Frontiers in Plant Science* 7:228916

Jurjevic Z, Wilson JP, Wilson DM, Casper HH (2007) Changes in fungi and mycotoxins in pearl millet under controlled storage conditions. *Mycopathologia* 164:229-239

Kaurav A, Pandya RK, Singh B (2018) Performance of botanicals and fungicides against blast of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Annals of Plant and Soil Research* 20:258-262

Kelly LA, Tan YP, Ryley MJ, Aitken EA (2017) *Fusarium* species associated with stalk rot and head blight of grain sorghum in Queensland and New South Wales, Australia. *Plant Pathology* 66:1413-1423

Landau EC, Pereira-Filho JA (2016) Cultivo do milheto. Embrapa Milho e Sorgo 3

Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell Publishers

Leslie JF, Zeller KA, Lamprecht SC, Rheeder JP, Marasas WFO (2005) Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283

Leslie JF (1995) *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany* 73:282-291

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF (2012) *Fusarium tupaense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 104:1408-1419

Maia NC, Melo MP, Guimarães SSC, Matos KS, Moreira SI, Lana UDP, Cardoso PG (2021). *Panicum maximum* as a reservoir of a potential maize pathogen. *European Journal of Plant Pathology* 159:95-104

Marcelo AV, Corá JE, Fernandes C (2012) Sequências de Culturas em Sistema de Semeadura Direta. I – Produção de Matéria Seca e Acúmulo de Nutrientes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 36:1553-1567

Montoya-Martínez AC, O'Donnell K, Busman M, Vaughan MM, McCormick SP, Santillán-Mendoza R, Pineda-Vaca D, Fernández-Pavía SP, Ploetz C, Benítez-Malvido J, Montero-Castro JC, Rodríguez-Alvarado G (2021) Malformation disease in *Tabebuia rosea* (rosy trumpet) caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. *Plant Disease* 105:2822-2829

Munkvold GP, Proctor RH, Moretti A (2021) Mycotoxin production in *Fusarium* according to contemporary species concepts. *Annual Review of Phytopathology* 59:373-402

Nicolli CP, Haidukowski M, Susca A, Gomes LB, Logrieco A, Stea G, Del Ponte EM, Moretti A, Pfenning LH (2020) *Fusarium fujikuroi* species complex in Brazilian rice: Unveiling increased phylogenetic diversity and toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology* 330:108667

O'Donnell K, McCormick SP, Busman M, Proctor RH, Ward TJ, Doeiring G, Geiser DM, Alberts JF, Rheeder JP (2018) Marasas et al. 1984 “Toxigenic *Fusarium* species: Identity and mycotoxicology” revisited. *Mycologia* 110:1058-1080

O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998a) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493

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

Onyike NBN, Nelson PE, Marasas WFO (1991) *Fusarium* species associated with millet grains from Nigeria, Lesotho and Zimbabwe. *Mycologia* 83:708-712

Oumar I, Mariac C, Pham JL, Vigouroux Y (2008) Phylogeny and origin of pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br) as revealed by microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics* 117:489-497

Petrovic T, Walsh JL, Burgess LW, Summerell BA (2009) *Fusarium* species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Australasian Plant Pathology* 38:373-379

Proctor RH, McCormick SP, Alexander NJ, Desjardins AE (2009) Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium*. *Molecular Microbiology* 74:1128–1142

Santillán-Mendoza R, Fernández-Pavía SP, O'Donnell K, Ploetz RC, Ortega-Arreola R, Vázquez-Marrufo G, Benítez-Malvido J, Montero-Castro JC, Soto-Plancarte A, Rodríguez-

- Alvarado G (2018) A novel disease of big-leaf mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. *Plant Disease* 102:1965-1972
- Santos R, Neves AL, Pereira LG, Verneque R, Costa CT, Tabosa J, Scherer C, Gonçalves L (2017) Divergence in agronomic traits and performance of pearl millet cultivars in Brazilian semiarid region. *Japanese Society of Grassland Science* 63:118–127
- Silva MA, Nascente AS, Frasca LLDM, Lanna AC, Lacerda MC, Silva CBD (2023) Biomass, nutrient accumulation, and weed suppression by mix of cover crops. *Revista Caatinga* 36:757-764
- Sharma N, Niranjana K (2018) Foxtail millet: Properties, processing, health benefits, and uses. *Food Reviews International* 34:329-363
- Singh P, Raghuvanshi RS (2012) Finger millet for food and nutritional security. *African Journal of Food Science* 6:77-84
- Singh R, Sunder S (2012) Foot rot and bakanae of rice: an overview. *Review of Plant Pathology* 5:565-604
- Vismar HF, Shephard GS, Westhuizen LVD, Mngqawa P, Bushula-Njah V, Leslie JF (2019) Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology* 296:31–36
- Wilson JP (2002) Fungi associated with the stalk rot complex of pearl millet. *Plant Disease* 86:833-839
- Yadav OP, Rai KN (2013) Genetic Improvement of Pearl Millet in India. *Agricultural Research* 2:275-292

Capítulo 2

Espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* causam podridão do colmo de milho granífero no Brasil

Egídio José Aragão da Ponte¹, Ana Caroline de Sousa Barros¹, Caroline de Marchi Bordon^{1,2}, João Victor Rodrigues Corso¹, Marileide M. Costa³, Gláucia M. Moreira¹, Ludwig H. Pfenning¹

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-900, Lavras MG, Brazil

² ATTO Sementes, Cuiaba MS, Brazil

³ Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands

Manuscrito em preparação para submissão na Tropical Plant Pathology

*Autor para correspondência: Ludwig H. Pfenning, e-mail: ludwig@ufla.br

2.1 Resumo

O milho granífero é uma planta adaptada a regiões áridas por sua rusticidade e destinada à alimentação animal e humana. Entre os fungos que causam doença na cultura, espécies do gênero *Fusarium* comprometem o rendimento da cultura e a segurança alimentar dos grãos, através da produção de micotoxinas. A literatura primária sobre a associação milho – *Fusarium* é escassa, embora tenha ocorrido vasta expansão da cultura no Brasil em tempo recente. Nesse estudo, foi investigado quais espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC podem ser encontradas em associação ao colmo de milho granífero e quais induzem sintomas de doença. A partir de colmos sintomáticos e assintomáticos foi obtida coleção de 18 isolados com características morfológicas de *Fusarium fujikuroi*, provenientes de diferentes regiões produtoras no Brasil. Foram identificadas seis diferentes espécies do FFSC por meio de análise de filogenia molecular de sequências da região gênica *tefl*. Todas as espécies causaram podridão do colmo no milho quando inoculadas em plantas jovens. A partir do conhecimento obtido é possível identificar e monitorar os agentes etiológicos, desenvolver estratégias para mitigar o possível dano e contribuir para o manejo fitossanitário. Também será possível subsidiar programas de melhoramento para seleção de híbridos resistentes. A possibilidade de que diversas gramíneas servem como fonte de inóculo de patógenos de importantes culturas, principalmente gramíneas, deve ser investigada.

Palavras chave: Doença de planta; Filogenia molecular; *Pennisetum glaucum*.

Abstract

Grain millet is a plant adapted to arid regions due to its rusticity and used for animal and human consumption. In Brazil, the crop has its main use as cover in no tillage systems, but also to forage and grain production. Among the fungi that cause disease in crops, species of the genus *Fusarium* compromise crop yield and grain food safety through the production of mycotoxins. The primary literature on the millet – *Fusarium* association is scarce, although there has been a vast expansion of the culture in Brazil in recent times. In this study, it was investigated which species of the *Fusarium fujikuroi* FFSC complex can be found in association with grain millet stalks and which ones induce disease symptoms. From symptomatic and asymptomatic stalks, a collection of 18 isolates with morphological characteristics of *Fusarium fujikuroi* was obtained, from different producing regions in Brazil. Six different FFSC species were identified through molecular phylogenetic analysis of *tefl* gene region sequences. All species caused stalk rot in millet when inoculated in young plants. Based on the knowledge obtained, it is possible to identify and monitor etiological agents, develop strategies to mitigate possible damage and contribute to phytosanitary management. It will also be possible to subsidize breeding programs to select resistant hybrids. The possibility that various grasses serve as a source of inoculum for pathogens of important crops, especially grasses, should be investigated.

Keywords: Molecular phylogeny; Plant disease; *Pennisetum glaucum*.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Isolados de FFSC obtidos de *Pennisetum glaucum* em 2021.

Lista de Figuras

Figura 1. Árvore obtida pelo método de máxima parcimônia inferida a partir de sequências do gene EF-1 α com sequências de isolados do complexo de espécie *Fusarium fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi* species complex - FFSC).

Figura 2. Morfologia geral do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*.

Figura 3. Colmos de milho cultivar ADRG 9060 inoculados com *Fusarium fujikuroi* 30 DAI.

Figura 4. Corte transversal de colmo de milho inoculados com *Fusarium fujikuroi*.

Figura 5. Boxplot das médias das notas atribuídas aos sintomas induzidos pelas espécies de *Fusarium fujikuroi* inoculadas em milho.

Legenda e Notas de rodapé

Figura 1. Árvore obtida pelo método de máxima parcimônia inferida a partir de sequências do gene EF-1 α com sequências de isolados do complexo de espécie *Fusarium fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi* species complex - FFSC). Os códigos em negrito representam sequências dos isolados deste estudo. Os demais códigos são concernentes a sequências de referência obtidas do GenBank. Valores de bootstrap $\geq 70\%$ (1.000 replicações) para máxima parcimônia estão indicados nos nós. Sequências de isolados de *Fusarium inflexum* (NRRL 20433) e *F. oxysporum* (NRRL 22902) foram utilizadas como outgroup. T = tipo; ET = epítipo; NT = neótipo.

Figura 2. Morfologia geral do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. **A-B:** Coloração de cultura de *F. pseudocircinatum* em meio BDA, **C-D:** Coloração de cultura de *F. proliferatum* em meio BDA, **E.** Esporodóquio formado por *F. pseudocircinatum* em folha de cravo, **F.** Mono- e polifiálides de *F. proliferatum*, **G.** Monofiálide com conídios em cadeia de *F. madaense*, **H.** Macroconídios de *F. gigantea*.

Figura 3. Colmos de milho da cultivar ADRG 9060 inoculados com *Fusarium fujikuroi* 30 DAI. **A.** Tratamento Controle Absoluto, **B.** Tratamento Controle, **C.** *F. brachiariae*, **D.** *F. madaense*, **E.** *F. fredkrugeri*, **F.** *F. proliferatum*, **G.** *F. gigantea*, **H.** *F. pseudocircinatum*.

Figura 4. Corte transversal de colmo de milho inoculados com *Fusarium*. **A.** Tratamento Controle Absoluto, **B.** Tratamento Controle, **C.** *F. brachiariae*, **D.** *F. madaense*, **E.** *F. fredkrugeri*, **F.** *F. proliferatum*, **G.** *F. gigantea*, **H.** *F. pseudocircinatum*.

Figura 5. Boxplot das médias das notas atribuídas aos sintomas induzidos pelas espécies de *Fusarium fujikuroi* inoculadas em milho. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos com 5% de significância.

2.2 Introdução

O milheto granífero (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.), originário do oeste africano, representa uma importante fonte nutricional para populações e criações animais nos continentes Africano e Asiático, com destaque para a Índia, maior produtora do grão (Oumar et al. 2008; Yadav e Rai 2013). Essa espécie é o principal representante do grupo dos “*millets*”, formado por espécies que apresentam similaridades morfológicas, como o formato das folhas e a produção de pequenos grãos arredondados. Compõe este grupo o Proso millet, o Foxtail millet e o Finger millet (Sharma e Niranjana 2018). No Brasil, o milheto granífero foi introduzido no final dos anos 20 do século passado no estado do Rio Grande do Sul para uso na alimentação animal e, recentemente, é cultivado principalmente na região do Cerrado brasileiro, como planta de rotação e incorporação no sistema de plantio direto. A expansão da cultura no Brasil se reflete nas áreas produtivas do milheto granífero, estimadas na ordem de 4 milhões de ha destinadas ao uso em cobertura e 300.000 ha destinadas a produção de grãos (ATTO 2024; Landau e Pereira-Filho 2016).

O milheto granífero é muito utilizado em regiões áridas ao redor do mundo, por se tratar de uma planta rústica e bem adaptada a este tipo de ambiente, sendo uma das poucas alternativas de alimento para as populações que vivem nessas localidades. A rusticidade da planta é atribuída a sua tolerância à seca, à acidez do solo e à baixa requisição de nutrientes, conferindo-lhe vantagem sobre o milho e o sorgo. Outros usos da cultura abrangem cobertura do solo, que protege o solo contra erosão, ciclagem e acúmulo de nutrientes com a incorporação da planta ao solo, aumento da disponibilidade hídrica, além de auxiliar no manejo de plantas daninhas (Boer et al. 2007; Guimarães et al. 2013; Landau e Pereira-Filho 2016; Marcelo et al. 2012; Silva et al. 2023).

Entretanto, a presença de patógenos pode comprometer o rendimento da cultura, por meio de doenças foliares, do colmo ou contaminação dos grãos (Chala et al. 2014; Choi et al. 2021; Kaurav et al. 2018; Wilson 2002). Espécies de *Fusarium* foram detectadas em associação a grãos de milheto no Oeste africano (Onyike e Nelson 1991). Foram relatadas 18 espécies de *Fusarium* associadas com grãos de “proso millet” na Coreia. *Fusarium fujikuroi*, *F. proliferatum* e *F. concentricum* apresentaram produção de fumonisinas (Choi et al. 2021).

Dentre os fungos associados à família *Poaceae*, espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) são relatadas frequentemente com diferentes hábitos: patógenos, saprófitas, endófitos ou produtores de micotoxinas, comportamentos observados em Cana-de-açúcar,

Arroz, Braquiária, Milho, Sorgo e Milheto granífero (Costa et al. 2019; Maia et al. 2021; Singh e Sunder 2012; Vismer et al. 2019).

Foi registrada a ocorrência de espécies de FFSC causando podridão do colmo do milheto nos EUA (Wilson 2002). Plantas de milheto, sorgo e milho apresentaram sintomas quando inoculadas por isolados obtidos da cana-de-açúcar, demonstrando que as espécies de FFSC não são limitadas ao hospedeiro da qual foram recuperadas (Costa et al. 2019). Faltam informações sobre a ocorrência de fungos do gênero *Fusarium* no milheto no Brasil. Com isto, o estudo objetiva elucidar a etiologia da podridão do colmo do milheto no Brasil.

2.3 Material e métodos

Isolamento e preservação

Foram obtidos isolados com características de *Fusarium* de plantas de milheto com e sem sintomas de podridão do colmo a partir de amostras provenientes de áreas de produção nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Tocantins e Goiás (Tabela 1). Foi realizado isolamento indireto de fungos, com lavagem das amostras em água corrente e disposição de fragmentos de 5-10 mm em placas contendo meio extrato de malte 2% (MA2%) com antibiótico estreptomicina (AB) e incubados a temperatura ambiente. Fragmentos de colônias de *Fusarium* foram transferidas para placas de poliestireno de 60 mm, contendo meio MA2%, para obtenção de culturas puras. Culturas monospóricas foram preservadas em água destilada e esterilizada, sob temperatura de 10°C e criopreservados em 15% de glicerol e -80°C, na Coleção Micológica de Lavras (CML).

Sequenciamento e análise de filogenia molecular

Os isolados foram cultivados em meio líquido de extrato de malte 2% durante 3 a 5 dias, temperatura de 25 a 28°C e mantidos no agitador de mesa orbital sob agitação de 100 rpm. Em seguida o micélio foi filtrado e macerado em nitrogênio líquido para o rompimento da parede celular. A extração seguiu protocolo básico utilizando CTAB (O'Donnell 1992). Para verificar a concentração do DNA extraído e sua pureza, as amostras foram observadas em aparelho NanoDrop 2000 e o produto da extração visualizado em gel de agarose 1,2%.

O fragmento do genoma amplificado foi o fator de alongação 1- α (*tef1*). Para o gene *tef1*, foram utilizados os primers Ef-1 e Ef-2 (O'Donnell et al. 1998). Ao final, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed (Biotium®) para verificar o tamanho do fragmento amplificado e posteriormente visualizados em

fotodocumentador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o PCR Products Purification Kit (Ludwig Biotecnologia) para serem sequenciados posteriormente.

Os fragmentos amplificados foram sequenciados nos sentidos senso e antisenso no laboratório da Psomagen (EUA). Os eletroferogramas obtidos foram analisados no programa SeqAssem® (Hepperle, 2004), no qual foram obtidas as sequências consenso. O alinhamento e a análise filogenética foram realizados utilizando o programa MEGA11 (Tamura et al., 2021). O alinhamento com sequências do gene *EF-1 α* consistiu de 467 pares de bases, sendo 124 posições informativas para parcimônia. O método de máxima parcimônia foi utilizado para obtenção da árvore filogenética, com 1000 replicações.

Caracterização morfológica e identificação de morfotipos

Foram avaliadas as características morfológicas para identificação de morfotipos (Costa et al. 2021; Ezekiel et al. 2020; Leslie e Summerell 2006; Maia et al. 2021; Nirenberg e O'Donnell 1998; Sandoval-Denis et al. 2018). Para avaliar a morfologia foram utilizados os protocolos de Leslie e Summerell (2006). As avaliações das características morfológicas foram realizadas nos isolados cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) incubados em câmara tipo BOD sob temperatura de 25°C por 4 dias no escuro para avaliação da taxa de crescimento das colônias (Leslie e Summerell 2006). As características micromorfológicas foram avaliadas em meio SNA com folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus*) para induzir a esporulação. Os isolados foram incubados em câmara BOD sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, por cerca de 10 a 15 dias nos quais as dimensões dos conídios produzidos no micélio aéreo e esporodóquio foram medidas, bem como a observação de seu formato e septação. As características dos conidióforos e a produção de clamidósporos também foram observadas.

Teste de patogenicidade

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio extrato de malte 2% juntamente com palitos previamente esterilizados para obtenção do inóculo, seguindo metodologia adaptada de Damicone et al. (1988), sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz durante 15 dias (Leslie e Summerell 2006). Plantas de *P. glaucum* cultivar ADR_G 9060 foram semeadas em vasos de 10 L contendo solo, areia e o substrato Carolina Soil (2:1:1). Após a emergência das plântulas foi realizado o desbaste deixando as duas plantas mais vigorosas no vaso. As plantas ficaram a céu aberto. A irrigação aconteceu conforme

necessidade hídrica. A adubação ocorreu a cada 15 dias com uso de 1g de NPK (4-14-8) em cada vaso.

Inoculações foram realizadas nos colmos após aproximadamente 45 dias da data do plantio, após a emissão da folha bandeira das plantas. Os colmos foram desinfetados com álcool 70% no terceiro entrenó expandido, seguido da inoculação com a inserção dos palitos, que permaneceram no colmo por 30 dias, até a realização da avaliação. As plantas controle tiveram palitos estéreis inseridos no colmo, como controle absoluto foram mantidas plantas sem qualquer intervenção (Damicone et al. 1988).

Cada tratamento consistiu de um isolado de cada espécie de FFSC identificada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, cada repetição foi representada por uma planta. Trinta dias após a inoculação foi realizada a avaliação da severidade da podridão do colmo no milheto, com base na escala de notas (Nicoli et al. 2015). Os colmos foram cortados transversalmente e o terceiro entrenó foi submetido a avaliação.

Foi realizado o reisolamento dos colmos para finalizar os postulados de Koch. O procedimento consistiu no corte de fragmentos do colmo, seguido pela desinfestação com álcool 70% e hipoclorito 2% por 30 segundos e 1 minuto, respectivamente. Os fragmentos foram lavados com água esterilizada e secos em papel filtro, sendo distribuídos em placas contendo meio malte 2%. As placas foram mantidas em temperatura ambiente para o crescimento das colônias, seguido da identificação dos morfotipos de *Fusarium*, realizada com base na morfologia descrita por Leslie & Summerell (2006). Os dados do teste de patogenicidade foram submetidos aos testes de Shapiro Wilk e Bartlett ($p > 0,05$) para verificar os pressupostos da análise de variância. Os dados apresentaram distribuição normal, sendo assim foram submetidos à análise de variância (Teste F $p < 0,05$) e quando significativo, as variáveis qualitativas serão comparadas com Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

2.4 Resultados

Os isolados foram identificados como sete espécies filogenéticas distintas: *Fusarium madaense* (n=8), *F. brachiariae* (n=5), *F. verticillioides* (n=4), *F. proliferatum* (n=2), *F. fredkrugeri* (n=1), *F. gigantea* (n=1), *F. pseudocircinatum* (n=1) (Figura 1). Os isolados de *F. verticillioides* foram recuperados da panícula do milheto. Os caracteres morfológicos avaliados condizem com a descrição das espécies (Costa et al. 2021; Ezekiel et al. 2020; Leslie e Summerell 2006; Maia et al. 2021; Nirenberg e O'Donnell 1998; Sandoval-Denis et al. 2018) (Figura 2).

Todas as espécies de FFSC testadas induziram sintomas de podridão do colmo quando inoculados, foram reisolados e identificados, ou seja, os postulados de Koch foram positivos. As plantas apresentaram os primeiros sintomas de podridão em 7 DAI, com a ampliação dos sintomas de necrose externos ao redor do local da inoculação até a avaliação em 30 DAI (Figura 3). Quando cortados transversalmente, foram observadas lesões direcionadas as extremidades do entrenó. No centro do entrenó foram verificadas regiões necrosadas com tons marrons e/ou avermelhados. Houve crescimento de colônias no local da inoculação em algumas espécies (Figura 4). Ocorreu diferença na severidade de todas as espécies inoculadas em relação aos controles. As maiores severidades foram de *Fusarium proliferatum* e *F. pseudocircinatum*, comparados as demais espécies (Figura 4).

2.5 Discussão

Com base na análise filogenética do *locus tef1*, marcadores morfológicos e testes de patogenicidade, *F. brachiariae*, *F. madaense*, *F. fredkrugeri*, *F. proliferatum*, *F. gigantea* e *F. pseudocircinatum* são agentes etiológicos da podridão do colmo de milho granífero no Brasil. Todos os isolados de *F. brachiariae* tiveram sua origem no estado do Mato Grosso, enquanto *F. madaense* foi encontrado nos estados da Bahia, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. As demais espécies apresentaram baixa frequência, todas nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Este é o primeiro estudo a identificar os agentes etiológicos da podridão do colmo do milho granífero no Brasil.

A interação de FFSC com milho tem registros desde a década de 1990, no oeste africano, com a descrição de diversas espécies de *Fusarium* associadas com os grãos de milho, entre elas *F. moniliforme* e *F. nygamai* (Onyike e Nelson 1991). Na África do Sul foi encontrado *F. pseudonygamai* associado ao milho, além de *F. verticillioides*, *F. andiyazi*, *F. nygamai*, e *F. thapsinum* associados a milho e sorgo (Leslie et al. 2005). O principal agente causal da podridão do colmo do milho nos EUA foi relatado como *F. moniliforme*, a partir das suas altas frequências na colonização de colmos em estádios precoces de desenvolvimento, sem confirmar a patogenicidade (Wilson 2002). O nome *Fusarium moniliforme* está em desuso, pois representa um morfotipo que compreende diversas espécies filogenéticas e biológicas do FFSC (Costa et al. 2022; Yilmaz et al. 2021).

No Brasil, o único relato de podridão em colmo de milho é oriundo de *Macrophomina phaseolina*, que causa a podridão seca do colmo (Landau e Pereira-Filho 2016). Não existem relatos de podridão de colmo causados por *Fusarium* spp. no Brasil. Também devem ser

destacadas as interações de espécies de FFSC com plantas de sorgo, frequentemente incluídas no grupo dos millets pela presença de grãos expostos. *Fusarium andiyazi* e *F. thapsinum* são classificados como alguns dos principais patógenos nesta cultura (Marasas et al. 2001; Leslie et al. 2005; Petrovic et al. 2009). Porém já foram recuperadas *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. sacchari* de colmos de sorgo na Tailândia (Nor et al. 2019), reforçando a afinidade de FFSC com gramíneas. *Fusarium madaense* também foi capaz de causar podridão de colmo em milho, sorgo e milheto, e deve ser considerada a capacidade de *F. mirum* em causar a doença, visto a proximidade genética entre essas espécies e *F. andiyazi* (Costa et al. 2022).

Todas as espécies de FFSC testadas causaram sintomas de podridão no colmo de milheto granífero, com sintomas similares aos descritos em literatura, com crescimento transversal do sintoma nos tecidos internos, por vezes com avermelhamento do interior do colmo (Kelly et al. 2017; Petrovic et al. 2009). Os sintomas e a patogenicidade de *Fusarium* em milheto só haviam sido relatadas em mudas (Akanmu et al. 2013), porém este estudo descreve a patogenicidade em plantas adultas, com o pleno desenvolvimento vegetativo da planta.

Dentre as espécies avaliadas, *F. proliferatum* é considerado o principal patógeno no complexo *fujikuroi* por causar doenças severas em diversos hospedeiros ao redor do mundo (Munkvold et al. 2021). *Fusarium pseudocircinatum* é conhecido como agente causal da má-formação em mangueira, ipê rosa e mogno (Freeman et al. 2014; Montoya-Martínez et al. 2021; Santillán-Mendoza et al. 2018). *F. gigantea* foi isolado e descrito como endófito de Braquiária, porém foi anteriormente isolado de milho (Rocha et al. 2011), informação encontrada por nosso grupo por meio de comparação de sequências via BLAST do NCBI, mecanismo que também nos permitiu verificar outros isolados desta espécie recuperados de ambientes hospitalares, este trabalho é o primeiro relato desta espécie como patógeno (Maia et al. 2021; Moretti et al. 2018; Rocha et al. 2011; Scheel et al. 2013; Venturini et al. 2018).

Por espécies do FFSC serem patógenos de milheto e capazes de causar doença em outros hospedeiros, principalmente gramíneas, mas também soja (Costa et al. 2019; Zhao et al. 2022), é recomendada atenção para a frequência da doença em campo, considerando o papel do milheto na agricultura atual brasileira, em rotação de culturas e em sistemas de plantio direto (Marcelo et al. 2012; Silva et al. 2023; Landau e Pereira Filho 2016). Assim, o uso de palhada oriunda de plantas de milheto infectadas pode atuar como fonte de inóculo para as principais espécies cultivadas no cerrado brasileiro, além do potencial de dispersão destes patógenos para novas regiões.

2.6 Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Proc. BPD 0568-22).

REFERÊNCIAS

- Abreu RCD, Kiefer C, Alves FV, Marçal DA, Oliveira BFD, Martins LP, Rosa EM (2014) Milheto em dietas de suínos em crescimento e terminação. *Ciência Rural* 44:1639-1644
- Akanmu AO, Abiala MA, Odebode AC (2013) Pathogenic effect of soilborne *Fusarium* species on the growth of millet seedlings. *World Journal of Agricultural Sciences* 9:60-68
- Alonso MP, De Moraes EHBK, Pereira DH, dos Santos Pina D, Mombach MA, Hoffmann A, Gimenez BM, Sanson RMM (2017) Pearl millet grain for beef cattle in crop-livestock integration system: intake and digestibility. *Semina: Ciências Agrárias* 38:1461-1471
- ATTO Sementes (2024) obtido de: <https://attosementes.com.br/grao-do-ano-de-2023-pela-onu-cultura-do-milheto-avanca-no-brasil>. Acesso em 31/05/2024 às 15:35
- Boer CA, Assis RLD, Silva GP, Braz AJBP, Barroso ALDL, Cargnelutti Filho A, Pires FR (2007) Ciclagem de nutrientes por plantas de cobertura na entressafra em um solo de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42:1269-1276
- Chala A, Taye W, Ayalew A, Krska R, Sulyok M, Logrieco A (2014) Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Garten) from Ethiopia. *Food Control* 45:29-35
- Choi JH, Nah JY, Lee MJ, Jang JY, Lee T, Kim J (2021) *Fusarium* diversity and mycotoxin occurrence in proso millet in Korea. *Food Science and Technology* 141:110964
- Costa MM, Melo MP, Guimarães EA, Veiga CMO, Carmo FS, Moreira GM, Costa SS, Pfenning LH (2019) Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with pokkah boeng of sugarcane in Brazil. *Plant Pathology* 68:1350-1360
- Costa MM, Melo MP, Carmo FS, Moreira GM, Guimarães EA, Rocha FS, Costa SS, Abreu LM, Pfenning LH (2021) *Fusarium* species from tropical grasses in Brazil and description of two new taxa. *Mycological Progress* 20:61-72
- Costa MM, Saleh AA, Melo MP, Guimarães EA, Esele P, Zeller KA, Summerell BA, Pfenning LH, Leslie JF (2022) *Fusarium mirum* sp. nov, intertwining *Fusarium madaense* and *Fusarium andiyazi*, pathogens of tropical grasses. *Fungal Biology* 126:250-266
- Damicone JP, Vineis PD, Manning, WJ (1988) Cross-pathogenicity of *Fusarium moniliforme* isolates from corn and asparagus. *Plant Disease* 14:774-777
- Ezekiel CN, Kraak B, Sandoval-Denis M, Sulyok M, Oyedele OA, Ayeni KI, Makinde OM, Akinyemi OM, Krska R, Crous PW, Houbraken J (2020) Diversity and toxigenicity of fungi and description of *Fusarium madaense* sp. nov. from cereals, legumes and soils in north-central Nigeria. *MycoKeys*:67-95

- Freeman S, Otero-Colina G, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía S, Maymon M, Ploetz RC, Aoki T, O'Donnell K (2014) First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. *Plant Disease* 98:1583-1583
- Guimarães CV, Assis RLD, Simon GA, Pires FR, Ferreira RL, Santos DCD (2013) Desempenho de cultivares e híbridos de milho em solo submetido a compactação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 17:1188-1194
- Hepperle D (2004) SeqAssem© A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Available at: <http://www.sequentix.de>
- Kaurav A, Pandya RK, Singh B (2018) Performance of botanicals and fungicides against blast of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Annals of Plant and Soil Research* 20:258-262
- Kelly LA, Tan YP, Ryley MJ, Aitken EA (2017) *Fusarium* species associated with stalk rot and head blight of grain sorghum in Queensland and New South Wales, Australia. *Plant Pathology* 66:1413-1423
- Landau EC, Pereira-Filho JA (2016) Cultivo do milho. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 3
- Leslie JF, Zeller KA, Lamprecht SC, Rheeder JP, Marasas WF (2005) Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell Publishers
- Maia NC, Melo MP, Guimarães SSC, Matos KS, Moreira SI, Lana UDP, Cardoso PG (2021) *Panicum maximum* as a reservoir of a potential maize pathogen. *European Journal of Plant Pathology* 159:95-104
- Marasas WF, Rheeder JP, Lamprecht SC, Zeller KA, Leslie JF (2001) *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia* 93:1203-1210
- Marcelo AV, Corá JE, Fernandes C (2012) Sequências de Culturas em Sistema de Semeadura Direta. I – Produção de Matéria Seca e Acúmulo de Nutrientes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 36:1553-1567
- Montoya-Martínez AC, O'Donnell K, Busman M, Vaughan MM, McCormick SP, Santillán-Mendoza R, Pineda-Vaca D, Fernández-Pavía SP, Ploetz C, Benítez-Malvido J, Montero-Castro JC, Rodríguez-Alvarado G (2021) Malformation disease in *Tabebuia rosea* (rosy trumpet) caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. *Plant Disease* 105:2822-2829
- Moretti ML, Busso-Lopes AF, Tararam CA, Moraes R, Muraosa Y, Mikami Y, Gonoï T, Taguchi H, Lyra L, Reichert-Lima F, Trabasso P, Hoog GS, Al-Hatmi AMS, Schreiber AZ, Kamei K (2018) Airborne transmission of invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies. *PLoS One* 13:e0196426

- Munkvold GP, Proctor RH, Moretti A (2021) Mycotoxin production in *Fusarium* according to contemporary species concepts. *Annual Review of Phytopathology* 59:373-402
- Nicoli A, Costa RV, Cota LV, Silva DD, Zambolim L, Lanza FE, Guimarães DP, Landau EC (2015) Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose do colmo do milho. *Ciência Rural* 45:1720-1726
- Nirenberg HI, O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:434-458
- Nor NMM, Salleh B, Leslie JF (2019) *Fusarium* species from Sorghum in Thailand. *The Plant Pathology Journal* 35:301
- O'Donnell K (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22:213-220
- 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
- Onyike NBN, Nelson PE, Marasas WFO (1991) *Fusarium* species associated with millet grains from Nigeria, Lesotho and Zimbabwe. *Mycologia* 83:708-712
- Oumar I, Mariac C, Pham JL, Vigouroux Y (2008) Phylogeny and origin of pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br) as revealed by microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics* 117:489-497
- Petrovic T, Walsh JL, Burgess LW, Summerell BA (2009) *Fusarium* species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Australasian Plant Pathology* 38:373-379
- Rocha LO, Reis GM, Da Silva VN, Braghini R, Teixeira MMG, Corrêa B (2011) Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 145:9-21
- Sandoval-Denis M, Swart WJ, Crous, PW (2018) New *Fusarium* species from the Kruger national park, South Africa. *MycoKeys* 34:63
- Santillán-Mendoza R, Fernández-Pavía SP, O'Donnell K, Ploetz RC, Ortega-Arreola R, Vázquez-Marrufo G, Benítez-Malvido J, Montero-Castro JC, Soto-Plancarte A, Rodríguez-Alvarado G (2018) A novel disease of big-leaf mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. *Plant Disease* 102:1965-1972
- Santos R, Neves AL, Pereira LG, Verneque R, Costa CT, Tabosa J, Scherer C, Gonçalves L (2017) Divergence in agronomic traits and performance of pearl millet cultivars in Brazilian semiarid region. *Japanese Society of Grassland Science* 63:118-127

Scheel CM, Hurst SF, Barreiros G, Akiti T, Nucci M, Balajee SA (2013) Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. *BMC Infectious Diseases* 13:1-12

Silva MA, Nascente AS, Frasca LLD, Lanna AC, Lacerda MC, Silva CBD (2023) Biomass, nutrient accumulation, and weed suppression by mix of cover crops. *Revista Caatinga* 36:757-764

Sharma N, Niranjana K (2018) Foxtail millet: Properties, processing, health benefits, and uses. *Food Reviews International* 34:329-363

Singh R, Sunder S (2012) Foot rot and bakanae of rice: an overview. *Review of Plant Pathology* 5:565-604

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: 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

Venturini TP, Al-Hatmi AM, Rossato L, Azevedo MI, Keller JT, Weiblen C, Santurio JM, Alves SH (2018) Do antibacterial and antifungal combinations have better activity against clinically relevant *Fusarium* species? *in vitro* synergism. *International Journal of Antimicrobial Agents* 51:784-788

Vismar HF, Shephard GS, Westhuizen LVD, Mngqawa P, Bushula-Njah V, Leslie JF (2019) Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains in vitro. *International Journal of Food Microbiology* 296:31-36

Wilson JP (2002) Fungi associated with the stalk rot complex of pearl millet. *Plant Disease* 86:833-839

Yadav OP, Rai KN (2013) Genetic Improvement of Pearl Millet in India. *Agricultural Research* 2:275-292

Yilmaz N, Sandoval-Denis M, Lombard L, Visagie CM, Wingfield BD, Crous PW (2021) Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 46:129-162

Zhao L, Wei X, Zheng T, Gou YN, Wang J, Deng JX, Li MJ (2022) Evaluation of pathogenic *Fusarium* spp. associated with soybean seed (*Glycine max*) in Hubei Province, China. *Plant Disease* 106:3178-3186

Anexos

Tabelas e figuras

Tabela 1. Isolados de FFSC obtidos de *Pennisetum glaucum* em 2021.

Espécies	CML ^a	Outros Códigos	Origem Geográfica ^b
<i>F. brachiariae</i>	4494	ACB 79	Lucas do Rio Verde MT
		ACB 81	Lucas do Rio Verde MT
		ACB 113	Ipiranga do Norte MT
		ACB 122	Ipiranga do Norte MT
	4497	ACB 124	Ipiranga do Norte MT
<i>F. fredkrugeri</i>	4496	ACB 118	São Gabriel do Oeste MS
<i>F. gigantea</i>	4499	ACB 473	Rondonópolis MT
<i>F. madaense</i>	4495	ACB 93	Água Boa MT
		ACB 133	Luís Eduardo Magalhães BA
		ACB 115	São Gabriel do Oeste MS
		ACB 132	Luís Eduardo Magalhães BA
	4501	ACB 134	Luís Eduardo Magalhães BA
		ACB 465	Primavera do Leste MT
		ACB 466	Primavera do Leste MT
		ACB 479	Formosa do Rio Preto BA
<i>F. proliferatum</i>	4498	ACB 464	Lucas do Rio Verde MT
		ACB 471	Rondonópolis MT
<i>F. pseudocircinatum</i>	4500	ACB 475	Rondonópolis MT
<i>F. verticillioides</i> ^c		ACB 213	Jataí GO
		ACB 345	Formosa do Rio Preto BA
		ACB 441	Sinop MT
		ACB 450	Aliança do Tocantins TO

^a CML, Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

^b Estados brasileiros: BA, Bahia; GO, Goiás; MT, Mato Grosso; MS, Mato Grosso do Sul; TO, Tocantins.

^c *F. verticillioides* encontrados na panícula de *P. glaucum*.

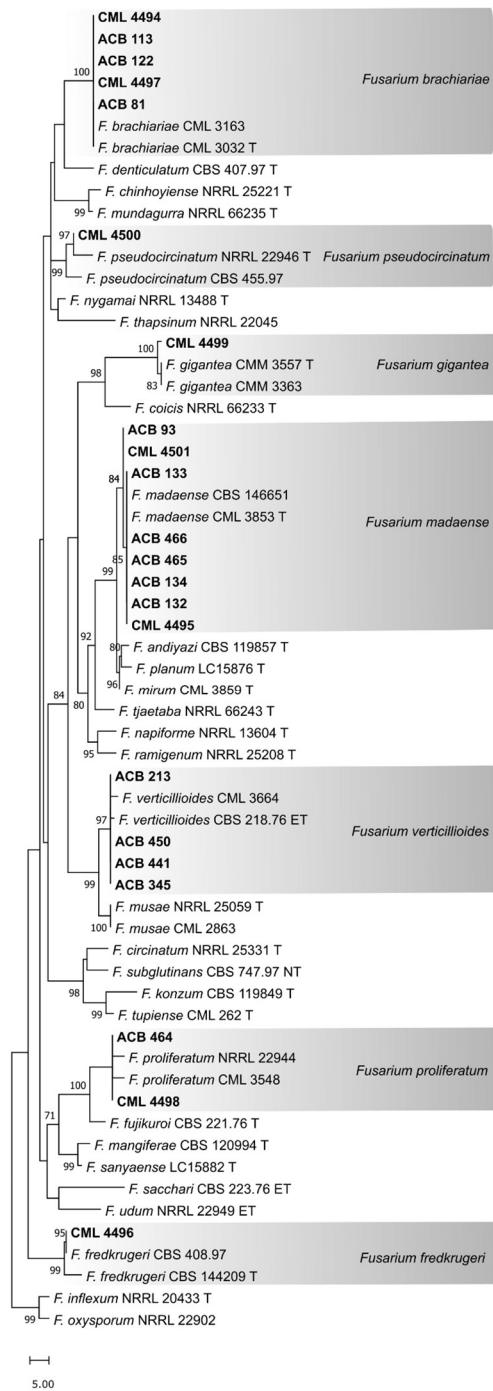


Figura 1. Árvore obtida pelo método de máxima parcimônia inferida a partir de sequências do gene *EF-1α* com sequências de isolados do complexo de espécie *Fusarium fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi* species complex - FFSC). Os códigos em negrito representam sequências dos isolados deste estudo. Os demais códigos são concernentes a sequências de referência obtidas do GenBank. Valores de bootstrap $\geq 70\%$ (1.000 replicações) para máxima parcimônia estão indicados nos nós. Sequências de isolados de *Fusarium inflexum* (NRRL 20433) e *F. oxysporum* (NRRL 22902) foram utilizadas como outgroup. T = tipo; ET = epitipo; NT = neótipo.

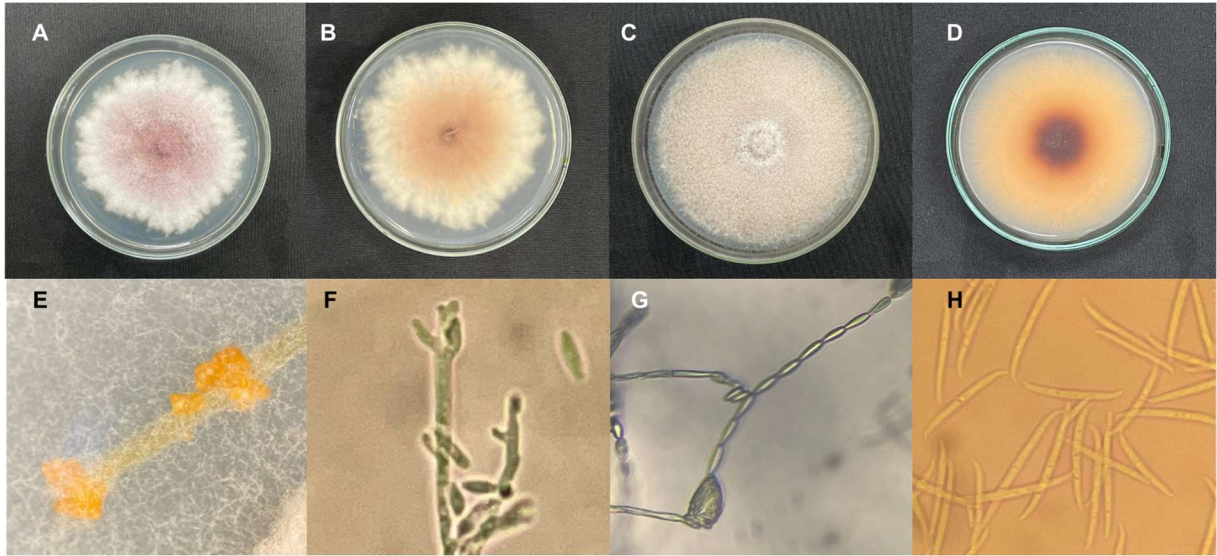


Figura 2. Morfologia geral do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. **A-B:** Coloração de cultura de *F. pseudocircinatum* em meio BDA, **C-D:** Coloração de cultura de *F. proliferatum* em meio BDA, **E.** Esporodóquio formado por *F. pseudocircinatum* em folha de cravo, **F.** Mono- e polifiálides de *F. proliferatum*, **G.** Monofiálide com conídios em cadeia de *F. madaense*, **H.** Macroconídios de *F. gigantea*.

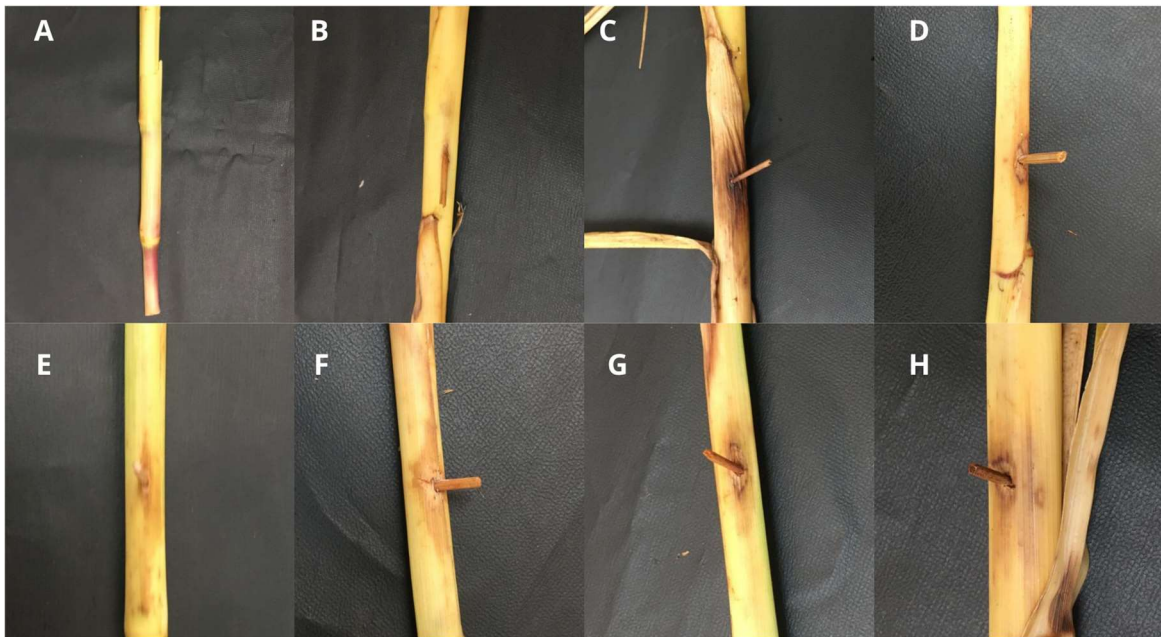


Figura 3. Colmos de milho da cultivar ADRG 9060 inoculados com *Fusarium fujikuroi* 30 DAI. **A.** Tratamento Controle Absoluto, **B.** Tratamento Controle, **C.** *F. brachiariae*, **D.** *F. madaense*, **E.** *F. fredkrugeri*, **F.** *F. proliferatum*, **G.** *F. gigantea*, **H.** *F. pseudocircinatum*.



Figura 4. Corte transversal de colmo de milho inoculados com *Fusarium fujikuroi*. **A.** Tratamento Controle Absoluto, **B.** Tratamento Controle, **C.** *F. brachiariae*, **D.** *F. madaense*, **E.** *F. fredkrugeri*, **F.** *F. proliferatum*, **G.** *F. gigantea*, **H.** *F. pseudocircinatum*.

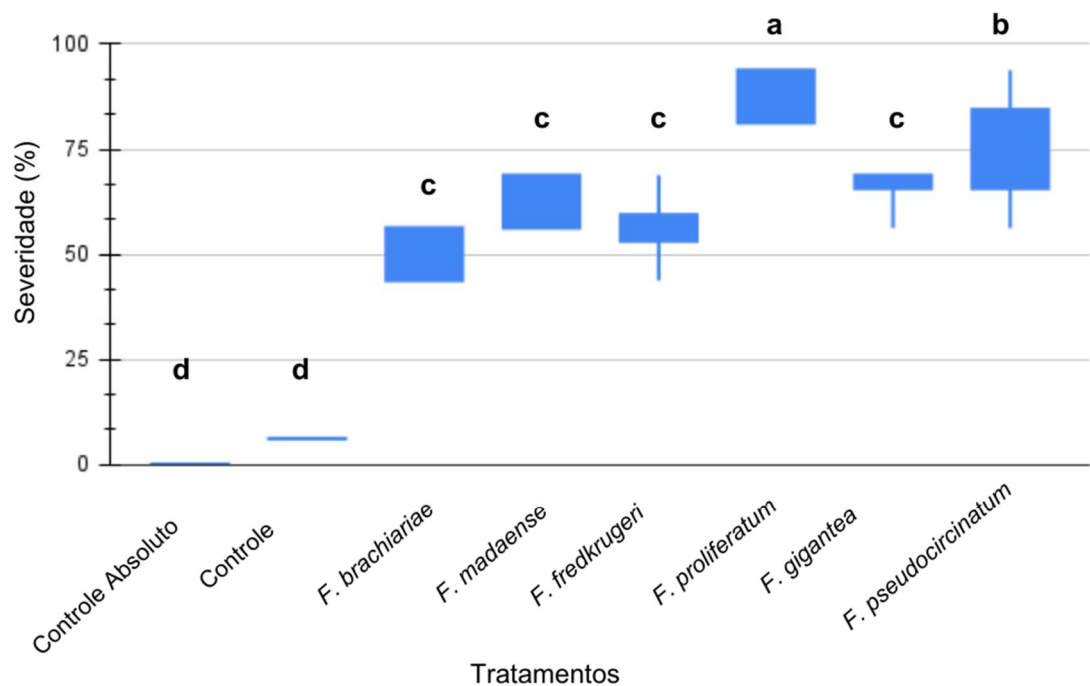


Figura 5. Boxplot das médias das notas atribuídas aos sintomas induzidos pelas espécies de *Fusarium fujikuroi* inoculadas em milho. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos com 5% de significância.